



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

PAPEL DOS MONÓCITOS, CÉLULAS DENDRÍTICAS CD16+ E MIELÓIDES DO SANGUE PERIFÉRICO PRODUTORES DE QUIMIOCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Ana Elisa Baptista Rodrigues

Coimbra

2011



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

PAPEL DOS MONÓCITOS, CÉLULAS DENDRÍTICAS CD16+ E MIELÓIDES DO SANGUE PERIFÉRICO PRODUTORES DE QUIMIOCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia e da Saúde de Coimbra e Assessor da Carreira Técnica Superior de Saúde no Centro de Histocompatibilidade do Centro, co-orientação da Doutora Isabel de Jesus Pereira Godinho de Velada.

Agradecimentos Agradeço aos meus orientadores, o Professor Doutor Artur Paiva e a Doutora Isabel Velada pelo apoio prestado.

Agradeço á Dra. Maria Luísa Pais, Directora do Centro de Histocompatibilidade do Centro a disponibilização de todos os recursos necessários á realização dos estudos laboratoriais subjacentes a esta Dissertação.

Agradeço à equipa de Citometria de Fluxo e à equipa de Biologia Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Centro por toda a colaboração prestada.

Júri

Mestre Ana Maria de Figueiredo Valado, Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde de Coimbra.

Professor Doutor José António Pereira da Silva, Professor Associado, com agregação à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Doutora Isabel de Jesus Pereira Godinho Velada.

Resumo

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune crónica caracterizada por autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos e vasculite sistémica. Os doentes com LES exibem numerosas alterações do sistema imune envolvendo as células B, células T e células apresentadoras de antígeno (APC) como os monócitos e células dendríticas, resultando numa activação e consequente aumento do processamento e apresentação de antígenos.

No LES, anormalidades nos monócitos e nas células dendríticas do sangue periférico, têm sido relatadas, encontrando-se essas alterações relacionadas com a fisiopatologia e actividade da doença. Estudos recentes descreveram alterações, quer no número destas células no sangue periférico quer da sua capacidade para produzir citocinas inflamatórias, estado de activação e expressão de receptores de quimiocinas.

As quimiocinas estão envolvidas na migração, tráfego e quimiotaxia de leucócitos e existe uma grande evidência que a infiltração de linfócitos T e outros leucócitos nos locais de inflamação tem um papel importante no LES. Estudos recentes têm mostrado elevadas concentrações séricas das quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP10) em doença activa.

Objectivos: Quantificar a expressão génica das quimiocinas inflamatórias IP-10, RANTES, MIG, MCP-1 e MIP-1 β , após separação celular, em Monócitos, Células Dendríticas (CD) CD16 $^{+}$ e CD mielóides com vista a esclarecer o papel destas células na fisiopatologia da doença.

Métodos: O estudo incluiu 73 indivíduos, 43 com LES, 18 com LES activo (LESA) e 25 com LES inactivo (LESI) e 30 controlos saudáveis. A frequência e número absoluto de monócitos e DC foram determinados por citometria de fluxo. A expressão das quimiocinas IP-10, RANTES, MIG, MCP-1, MIP-1 β foi quantificada por PCR em tempo real.

Resultados: Em monócitos purificados observou-se um aumento da expressão de mRNA de CCL2, CXCL9 e CXCL10 no grupo de LESA comparado com o grupo de Controlo. Não foram encontradas diferenças na expressão de mRNA de CCL4 e CCL5 nos grupos em estudo.

Relativamente ao subgrupo de CD, CD14 $^{-/low}$ CD16 $^{+}$ o perfil de expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 foi similar ao encontrado em monócitos. Nas CD mielóides não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente à expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10.

Conclusão: O aumento da expressão de mRNA de quimiocinas nos monócitos e nas CD CD14 $^{-/low}$ CD16 $^{+}$ do sangue periférico em doentes com LES parece estar relacionada com a fisiopatologia e actividade da doença.

Palavras passe: LES, monócito, célula dendrítica CD14 $^{-/low}$ CD16 $^{+}$, quimiocinas

Abstract

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, inflammatory autoimmune disease characterized by autoantibodies, immune complex formation and systemic vasculitis.

Patients with SLE exhibit aberrations of the immune system involving B cells, T cells and antigen presenting cells (APC), such as monocytes and dendritic cells, resulting in activation and consequent increase antigen processing and presentation.

Abnormalities in monocytes and peripheral blood dendritic cells subsets have been reported in SLE and are related with disease physiology and activity.

Recent studies have described changes, both in the number of these cells in peripheral blood or in their ability to produce inflammatory cytokines, activation state and expression of chemokine receptors.

Chemokines are involved in the migration and chemotaxis of leukocyte traffic and there is a strong evidence that the infiltration of leukocytes at sites of inflammation plays a major role in SLE. Recent studies have shown elevated serum concentrations of the chemokines CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG) and CXCL10 (IP10) in active disease.

Aims: Quantify and determine the gene expression of the inflammatory chemokines IP-10, RANTES, MIG, MCP-1, and MIP-1 β on purified Monocytes, myeloid Dendritic Cells (DC) and CD16+ DC in order to clarify the role of these cells in the physiology of the disease.

Methods: 73 individuals were recruited, 43 with SLE, 18 with active disease (ASLE), 25 with inactive disease (ISLE) and 30 healthy individuals were also include as control group (HG). The frequency and absolute number of monocytes and DC populations was determined by flow cytometry. The mRNA expression of chemokines IP-10, RANTES, MIG, MCP-1, MIP-1 β in SLE patients was quantified by real time PCR

Results: In purified monocytes an increased of CCL2, CXCL9 and CXCL10 mRNA expression was found in ASLE compared to HG, and no differences were found for CCL4 and CCL5. Regarding CD14-CD16+ dendritic cell (DC) subset, the obtained profile of mRNA expression was similar to those found on monocytes. On myeloid DC no differences were found regarding chemokines CXCL9 and CXCL10 mRNA expression in the studied groups.

Conclusion: Abnormalities in chemokine expression among peripheral blood monocytes and CD16+ dendritic cells in SLE appear to be related to SLE pathophysiology and disease activity.

Keywords: SLE, monocyte, dendritic cells CD14^{-low}CD16⁺, chemokines

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJECTIVOS	8
3.	RESUMO DO ARTIGO	9
3.1.	INTRODUÇÃO	9
3.3.	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.4.	RESULTADOS	10
3.5.	DISCUSSÃO DO ARTIGO	12
3.6.	ARTIGO	14
4.	DISCUSSÃO	29
5.	CONCLUSÃO	34
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune sistémica com diversas e variáveis manifestações clínicas envolvendo vários órgãos e sistemas como o sistema nervoso central, linfático, articular gastrointestinal, renal, cardiovascular, hematológico, pleural e pulmonar. (1) As principais características da doença incluem a inflamação e distúrbios nos vasos sanguíneos, como a vasculopatia oclusiva, a vasculite e a deposição de complexos imunes. Os órgãos mais afectados e também os mais estudados no Lúpus são os rins e a pele. (2-3) Esta doença ocorre desde as lesões na pele até à artrite, nefrite e comprometimento do sistema nervoso central. (4)

Para os clínicos é uma doença importante pois é potencialmente fatal e facilmente confundida com muitas outras. Os imunologistas vêm também no Lúpus uma importante área de estudo, pois todo o sistema imune está envolvido no mecanismo da doença. A prevalência do lúpus corresponde a aproximadamente 40 casos por 100.000 pessoas no norte da Europa. Nos Estados Unidos, o número de doentes estende-se até aos 250.00 casos. Esta doença é 10 vezes mais comum em mulheres em idade fértil do que em homens. A acção do metabolismo do estrogénio foi demonstrada em doentes com LES uma vez que actua em vários tipos celulares e as suas concentrações facilitam a resposta humoral e levam ao aumento da proliferação das células B e produção de anticorpos. (2-3) Os critérios de classificação dos doentes foram desenvolvidos para criar grupos homogéneos que combinam sinais clínicos e sintomas com anomalias detectadas em testes sanguíneos, como anticorpos antinucleares, trombocitopenia e anticorpos antifosfolipídicos. (5) O Lúpus Eritematoso Sistémico tem períodos de actividade e inactividade da doença e o tratamento actua em 3 vertentes; a) gerir os períodos de agudização, b) minimizar os riscos de crise durante o período estável e c) controlar os sintomas. A nefrite lúpica é a complicação que acarreta mais risco de vida. A hidroxicloroquina, o rituximab, anti-inflamatórios não esteróides, corticóides e imunossuppressores são usados no tratamento do Lúpus. (3, 5) Muitos progressos foram feitos na última década para esclarecer a fisiopatologia e a etiologia da doença. Foram encontrados novos genes e *loci* associados á expressão de LES. Estudos extensos levaram à descoberta dos mecanismos bioquímicos aberrante que regulam a função da célula T e a produção de citocinas, que conduziram ao desenvolvimento de novas terapêuticas e de biomarcadores da doença. (6)

A etiologia exacta da doença permanece ainda desconhecida, no entanto, pensa-se que uma extrema, complicada e multifactorial interacção entre factores genéticos e ambientais estejam provavelmente envolvidos. (1-2) O LES apresenta uma forte transmissão genética com maior frequência entre parentes do 1º grau. A doença manifesta-se em gémeos idênticos com uma frequência aproximada de 25 a 50% e em gémeos falsos com uma frequência de cerca de 5%. (2) Existem, contudo, alguns genes que reúnem algum consenso quanto ao seu papel na susceptibilidade da doença, como por exemplo pacientes com deficiências homozigóticas dos componentes do sistema complemento. (2) É estimado que sejam necessários 4 genes com importância de susceptibilidade para o desenvolvimento da doença. (2) Estes incluem alelos que codificam antígenos do complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), que estão relacionados com a apoptose, moléculas estimulatórias e inibitórias, genes dos receptores da porção Fc das IgG (FcγR), moléculas sinalizadoras e seus ligandos, citocinas e seus receptores, do complemento, entre outros. (1-3) Relativamente a factores ambientais e epidemiológicos a exposição a raios ultravioleta é o factor desencadeante do lúpus eritematoso cutâneo. (4) Alguns vírus têm sido também propostos como desencadeadores do lúpus, nomeadamente o citomegalovírus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o parvovírus, bem como algumas drogas que causam uma variante de lúpus induzida por drogas. (2, 5)

Esta patologia é caracterizada pela produção contínua de auto-anticorpos maioritariamente contra antígenos nucleares, como o anti-DNA de cadeia dupla (ds-DNA), anti-complexo de ribonucleoproteína (Ro), anti-proteína de ligação de RNA (La) e anti-proteína ribonuclear de pequeno tamanho (Sm), sendo estes específicos para o Lúpus e que fazem parte do critério de classificação, presentes em 95% dos doentes. (1-3) A produção de anticorpos deve-se a alterações do sistema imune que envolvem células B, T e da linhagem monocítica que resultam na activação policlonal de células B, no aumento do número de células produtoras de anticorpos, hipergamaglobulinémia, produção de autoanticorpos e formação de imunocomplexos. (2) As células T são estimuladas por antígenos específicos, processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APC), podendo esses mesmos antígenos ligarem-se às imunoglobulinas na superfície das células B. Tanto as APC como as células B processam os antígenos em peptídeos e apresentam-nos às células T através de moléculas HLA. (2) As células T activadas estimulam, por sua vez, as células B levando à produção de anticorpos sendo esta interacção facilitada por várias citocinas, como a IL-10 e por outras

moléculas como as do sistema CD40/CD40L e B7/CD28/CTLA-4 para iniciar um segundo sinal de activação. (2)

Um mecanismo regulador defeituoso na *clearance* das células apoptóticas e complexos imunes está também na origem do desenvolvimento do LES. O processo de apoptose ou morte celular programada é um processo ordenado que leva à destruição da célula evitando que o conteúdo intracelular passe para o exterior, não desencadeando um processo inflamatório. Em circunstâncias normais as células apoptóticas são capturadas pelos macrófagos, no entanto este processo no LES está alterado. Isto resulta em parte do número reduzido de receptores CR1 do complemento, bem como de outros receptores da superfície celular. Isto resulta numa fagocitose inadequada dos complexos imunes formados quer por IgG2 quer por IgG3.(2)

Os monócitos pertencem ao sistema mononuclear fagocítico e são descritos como os precursores dos macrófagos tecidulares. (7) Estes são células versáteis que visam a defesa do organismo, regulam a inflamação e induzem imunidade. Os monócitos são gerados a partir de progenitores mielóides CD34+, uma característica que partilham com os eritrócitos e plaquetas. (8) Estas células mielóides derivadas da medula óssea e os seus grupos incluindo os macrófagos tecidulares, células Kupffer e células dendríticas, estão equipadas com um arsenal de sensores inatos de forma a reconhecerem os padrões moleculares dos antígenos. Os monócitos são definidos pelo seu grande tamanho, actividade significativa de peroxidase e capacidade para mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpo. (9)

Os monócitos circulantes diferenciam-se em macrófagos tecidulares e adquirem fenótipos e funções diferentes dependendo do microambiente onde estão envolvidos. (8, 10) A principal função do sistema Monócito/Macrófago é a fagocitose e a subsequente apresentação do antígeno. Estes reconhecem e removem agentes patogénicos, assim como células mortas e danificadas do hospedeiro. A fagocitose é um processo que requer a activação de receptores que transmitem sinais para o interior da célula e após a digestão do alvo, os antígenos gerados são apresentados às células T, resultando numa resposta efectora. Consequentemente os monócitos possuem um papel inicial na resposta imune. (10) Os monócitos circulantes estão divididos em 2 grupos conforme a expressão de CD14, receptor de lipopolissacarídeos e de CD16 (FcγR-III). Aproximadamente 90% dos monócitos expressam altos níveis de CD14 mas não de CD16 (CD14⁺/CD16⁻), os restantes 10% expressam CD16⁺ e baixos níveis de CD14 (CD14^{low}/CD16⁺). (11) Estes marcadores expressos na superfície dos monócitos sugerem funções distintas. Os monócitos CD14⁺CD16⁺ encontram-se aumentados durante

infecções e produzem altos níveis de factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* - TNF α) e baixos níveis de IL-10 e são chamados monócitos pró-inflamatórios. A activação dos monócitos resulta da regulação das moléculas de superfície e da secreção de múltiplas monocinas que participam em várias funções de quimiotaxia (CCR2, MCP-1), de adesão (eg, ICAM-I), de fagocitose, de apresentação de antígenos, de modulação da resposta efectora dos linfócitos e de diferenciação em macrófagos. (7-8, 10, 12)

Relativamente ao Lúpus Sistémico Eritematoso os estudos iniciais sobre os monócitos incidiam na fagocitose defeituosa por parte destas células, o que permite a acumulação de detritos apoptóticos, levando à produção de DNA circulante e de nucleossomas, que são a maior fonte de autoantígenos apresentados, levando a um fenómeno autoimune. Os estudos mais recentes exploram, no entanto, mais o papel activo dos monócitos e macrófagos na inflamação e lesão tecidual. (10)

Foi também demonstrado que os monócitos podem diferenciar-se em células dendríticas e desenvolver um papel importante na imunidade inata e adquirida. (7, 10) Estudos recentes revelam alterações nos fenótipos e funções dos monócitos e células dendríticas no LES. (6, 10, 12)

As células dendríticas são altamente especializadas na apresentação de antígenos, têm origem na medula óssea, são libertadas para a corrente sanguínea e distribuem-se por vários tecidos. A função das células dendríticas varia de acordo com o seu estado de maturação. As células dendríticas imaturas são capazes de capturar e processar o antígeno, e após a sua migração para os órgãos linfóides, onde se tornam maduras, a sua capacidade de processar e captar o antígeno decresce e a função de apresentação do antígeno aumenta. O processo de maturação das células dendríticas induz a diferenciação das células T *naïve* em células T *helper* efectoras, com o consequente aumento de expressão de moléculas de adesão, da produção de citocinas e dos receptores de citocinas (13-14).

Esta activação está relacionada com uma elevada expressão de moléculas MHC, de adesão e co-estimulatórias, e com a produção de citocinas. Várias subpopulações de células dendríticas foram encontradas em tecidos humanos. As células dendríticas não são um grupo de células homogéneas e pelo menos 2 subpopulações foram identificadas no sangue periférico, as CD mielóides e as CD plasmacitoídes, um terceiro subgrupo foi identificado pela reactividade com o anticorpo monoclonal M-DC8 e pela expressão do receptor Fc γ RIII (CD16). (7, 12) Aparentemente estas células dendríticas CD16⁺/CD14^{-/low} apresentam fraca actividade como células apresentadoras de antígeno e são consideradas, por alguns autores, uma subpopulação de monócitos. (15) Recentemente,

o papel das células dendríticas tornou-se mais importante na patologia do Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), contribuindo para a deficiência na manutenção da tolerância a antígenos próprios como na inflamação, existindo a hipótese desta doença ser conduzida por uma activação continuada destas células. (14)

Vários estudos sugerem que a diferenciação dos monócitos em macrófagos *versus* células dendríticas é controlada por quimiocinas e por factores de activação e diferenciação. Os vários subgrupos de monócitos estão dotados de diferentes capacidades migratórias, de recrutamento e de plasticidade, que parecem ser mediados por quimiocinas. (7)

As quimiocinas são um grupo de pequenas moléculas (~8-14kDa), estruturalmente relacionadas, que regulam o tráfego dos vários tipos de leucócitos através de receptores transmembranares acoplados a proteína G. Cerca de 50 quimiocinas, e pelo menos 15 receptores foram identificados em humanos. As quimiocinas desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória e actuam em diversos processos biológicos, tais como a hematopoiese, a angiogenese e a metastização de tumores. A sua acção incide sobre os neutrófilos, os monócitos, os linfócitos e os eosinófilos. (16-19)

As quimiocinas estão divididas em 2 grandes subfamílias definidas de acordo com a posição e o espaçamento dos 4 resíduos terminais conservados de *N-cisteína*. O grupo CC, se os resíduos de cisteínas são seguidas, e o grupo CXC se as cisteínas são separadas por um aminoácido. Outras 2 classes também foram descritas, a Fractalcina ou CX3C quimiocina, com 3 aminoácidos entre os terminais de *N-cisteína* e as C-quimiocinas, como a linfotactina não possui nenhum aminoácido. (16, 20-21)

Muitos dos genes que codificam as quimiocinas foram mapeados, os genes da família das quimiocinas CC encontram-se no cromossoma 17 e as CXC no cromossoma 4. (16, 21)

Os receptores de quimiocinas dividem-se em 4 grupos: CCR; CXCR; XCR e CX3CR. Uma única quimiocina pode ligar-se a vários receptores dentro da mesma família CC e CXC e um único receptor pode ligar-se a várias quimiocinas diferentes. (16, 20-22)

As quimiocinas participam nestes processos de migração dos leucócitos, diferenciação, adesão e activação. Algumas quimiocinas estão implicadas em doenças autoimunes como o LES, artrite reumatóide e esclerose sistémica. (19, 23-24)

As quimiocinas contribuem para o fluxo de leucócitos em direcção aos sítios dos tecidos inflamados e tem um papel muito importante na homeostase e funcionamento do sistema imune. (20, 25)

A localização apropriada das células monocíticas nos órgãos linfóides secundários e o seu recrutamento para os sítios de inflamação em resposta a estímulos quimiotáticos são importantes para o normal desenvolvimento de uma resposta imune. (22)

As quimiocinas são secretadas em resposta a sinais como os das citocinas pró-inflamatórias e após ligação ao seu receptor iniciam uma cascata de sinalização intracelular que promove a migração dos leucócitos mediante um gradiente de quimiocinas. (21, 26)

As quimiocinas e os seus receptores estão implicados no tráfego de leucócitos, na activação de integrinas, na propagação e locomoção celular, na migração transendotelial, libertação de mediadores inflamatórios e podem também regular respostas imunes. (23)

As quimiocinas estão também agrupadas, segundo as suas principais funções, em homeostáticas e inflamatórias. As quimiocinas inflamatórias controlam o recrutamento dos leucócitos para as zonas de inflamação e lesão tecidual, enquanto as homeostáticas estão envolvidas na migração dos leucócitos para os órgãos linfóides secundários, na medula óssea e durante a hematopoiese. (20-21)

Estes processos requerem uma regulação precisa que actua em 3 níveis diferentes: regulação da produção de quimiocinas, regulação dos seus receptores e a sua dessensibilização e a acção de quimiocinas actuando como antagonistas. (17)

Um dos papéis das quimiocinas nas doenças autoimunes como o Lúpus Eritematoso Sistémico é o de orquestrar a migração de leucócitos para órgãos específicos levando à sua acumulação durante a doença. (18)

A CCL2 (CC), também conhecida como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), é uma proteína humana codificada pelo gene CCL2 pertencente à família das quimiocinas C-C. É a principal quimiocina responsável pela migração e infiltração de monócitos/macrófagos. Esta recruta também linfócitos T de memória, células dendríticas e NK para os tecidos. Foi a primeira quimiocina humana a ser descoberta e liga-se a um único receptor, o CCR2. (16, 20-21)

A CCL4 ou MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein 1-beta), é codificada pelo gene CCL4 e tem especificidade para o receptor CCR5. Esta proteína é produzida por monócitos após estímulo pelas endotoxinas bacterianas e tem uma função crucial na resposta à infecção e inflamação. Estas quimiocinas activam os granulócitos e podem levar a inflamações agudas mediadas por neutrófilos, induzem a síntese e libertação de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α por fibroblastos e macrófagos. A MIP-1 β é conhecida pelas suas propriedades quimiostáticas e pró-inflamatórias promovendo também a homeostase. (16, 20)

A quimiocina CCL5 é uma proteína codificada pelo gene CCL5 também conhecida como RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell, expressed and secreted*) e é classificada como uma citocina quimiostática para células T, eosinófilos, basófilos, células NK e células dendríticas. Esta quimiocina tem um papel activo no recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação. Os receptores de CCL5 são o CCR1, CCR3 e CCR5. O gene RANTES foi identificado como um gene que se expressa tardiamente após a activação de células T. (16, 20, 27)

O CXCL9 é uma quimiocina que pertence à família CXC sendo também conhecida por monocina induzida por IFN- γ (MIG). Esta quimiocina exerce as suas funções de quimiotaxia através do receptor CXCR3. Os monócitos migram para os nódulos linfáticos em resposta a esta quimiocina. (16, 20, 28)

A quimiocina CXCL10, também conhecida como proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10), é secretada por vários tipos celulares em resposta ao IFN- γ , incluindo monócitos, células endoteliais e fibroblastos. Esta quimiocina tem várias funções como a quimioatração de monócitos e macrófagos, células T, células NK e células dendríticas, promove a adesão de células T ao endotélio celular e tem actividade anti-tumoral. Esta molécula é funcionalmente caracterizada como uma quimiocina associada ao subtipo funcional de células T, Th1. A sua acção desenvolve-se através da ligação ao receptor de superfície celular de quimiocina CXCR3. (16, 20) A sua expressão aumentada em tecidos e no soro foi associada a várias doenças autoimunes como a artrite reumatóide, o LES, esclerose sistémica, síndrome de Sjögren, entre outros. A CXCL10 e o seu receptor têm um papel importante na migração dos leucócitos para os tecidos inflamados e na perpetuação da inflamação com um consequente dano tecidular. (29)

Um grande número de estudos identificou um aumento da concentração de quimiocinas no plasma, incluindo a CCL5 (RANTES), a CCL2 (MCP-1), a CXCL10 (IP-10) e a CXCL 9 (MIG) em pacientes com doença activa em LES. (24, 30-31)

2. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo a quantificação da frequência e valor absoluto dos monócitos, das células dendríticas CD14^{+/low}CD16⁺ e das células dendríticas mielóides; tal como o estudo da expressão génica de várias quimiocinas, após *cell sorting*, nomeadamente a CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP10), CCL2 (MCP-1) e CXCL9 (MIG). Com este estudo pretendeu-se avaliar a distribuição destas populações celulares no sangue periférico, bem como a sua capacidade de produção de quimiocinas demonstrando assim a sua importância na fisiopatologia do LES.

Este objectivo conduziu à publicação do seguinte artigo à revista *Clinical and Development Immunology*, seguindo-se um breve resumo deste artigo em Português, onde se incluem os resultados referentes à quantificação das células estudadas, em percentagem e valor absoluto (células por microlitro de sangue), bem como o artigo completo em Inglês.

Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus

Tiago Carvalho^{1***}, Ana Rodrigues^{2***}, Ana Lopes^{2***}, Luís Inês^{3, 4, 5}, Isabel Velada¹, Andreia Ribeiro¹, António Martinho¹, José AP Silva^{3, 5}, Maria L Pais¹, Artur Paiva^{1,2}

3. RESUMO DO ARTIGO

3.1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Sistémico Eritematoso (LES) é uma doença multissistémica causada por autoanticorpos contra uma vasta variedade de autoantígenos, caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas e múltiplas anormalidades celulares. As principais manifestações patológicas em LES são a inflamação, a vasculite, a deposição de complexos imunes e a vasculopatia. A etiologia exacta da doença permanece desconhecida mas um defeito na *clearance* de material apoptótico ou uma apoptose aberrante em combinação com uma predisposição genética estão envolvidos no desenvolvimento e progressão do LES.

Os doentes com LES exibem inúmeras aberrações no sistema imune envolvendo as células B, células T e células apresentadoras de antígeno (APC), como os monócitos e células dendríticas, resultando na activação das células B e T e o consequente aumento do número de células produtoras de anticorpos.

Anomalias no fenótipo e nas funções dos monócitos foram identificadas em doenças autoimunes severas incluindo o LES. Também os subgrupos de células dendríticas estão implicados na patogénese e progressão do LES. Estudos recentes descreveram alterações no número e na capacidade de produzir citocinas inflamatórias, estados de activação e expressão de receptores de quimiocinas nas células dendríticas do sangue periférico, nomeadamente nas CD mielóides e derivadas do monócito, CD14⁻/_{low} CD16⁺.

As quimiocinas têm um papel importante na migração e tráfego de leucócitos, necessário para a iniciação de uma resposta imune celular nos locais de inflamação e regulação do recrutamento diferencial de linfócitos T *helper* (Th1 e Th2). Existem evidências que sugerem que a infiltração de linfócitos T e outros leucócitos nos sítios de inflamação exercem um papel crítico no envolvimento dos vários órgãos afectados no LES. Foi também reportada a importância das quimiocinas e os seus receptores na regulação do tráfego e migração da inflamação, sugerindo assim, um importante papel na fisiopatologia das doenças autoimunes.

Neste contexto avaliámos a expressão de mRNA das quimiocinas CCL2, CCL4, CCL5, CXCL9 e CXCL10 nos monócitos, mDCs e CD14⁻/_{low} CD16⁺ do sangue periférico de doentes com LES e num grupo controlo.

3.2. OBJECTIVOS

Quantificar a frequência e valor absoluto dos monócitos e dos subgrupos de células dendríticas do sangue periférico e a expressão de mRNA das quimiocinas CCL2, CCL4, CCL5, CXCL9 e CXCL10 nestas células, avaliando desta forma a importância destas células e destas quimiocinas clarificando o seu papel na fisiopatologia do LES.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram recrutados do Departamento de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, 43 doentes com LES, 18 destes com doença activa (LESA) e 25 com doença inactiva (LESI), de acordo com os critérios de avaliação *1997 American College of Rheumatology e Disease Activity Index 2000 (SLEDAI, 2k)*. Para grupo controlo foram incluídos 30 indivíduos saudáveis.

As populações de monócitos e células dendríticas foram separadas por *Cell Sorting* usando anticorpos monoclonais.

A quantificação da expressão genética foi feita por PCR em tempo real de mRNA extraído de células purificadas.

3.4. RESULTADOS

Frequência e valor absoluto de monócitos e subpopulações de células dendríticas CD14^{-/low}CD16⁺ e mDC

Como se verifica na Tabela 1, observou-se uma diminuição, quer em valor absoluto quer em percentagem, de todas as subpopulações celulares estudadas no grupo LES com doença activa, atingindo significado estatístico para o valor absoluto de monócitos e para a percentagem de mDC.

Tabela 1 - Media \pm desvio padrão da percentagem e do valor absoluto de monócitos, de células dendríticas derivadas do monócito e de células dendríticas mielóides do sangue periférico no grupo de doentes com LES Activo e Inactivo e no grupo controlo.

	CONTROLOS	DOENÇA ACTIVA	DOENÇA INACTIVA
Monócitos %	3,9 \pm 0,97	3,02 \pm 1,61	3,56 \pm 1,32
Mónocitos/ μ l	284,6 \pm 84,2*	193,3 \pm 97,5	228,4 \pm 87,1
CD16+ %	0,54 \pm 0,29	0,45 \pm 0,30	0,55 \pm 0,33
CD16+ / μ l	39,2 \pm 23,2	28,1 \pm 20	34,1 \pm 19,1
mDC%	0,29 \pm 0,18 *	0,21 \pm 0,15 *	0,29 \pm 0,32
mDC/ μ l	21,4 \pm 15,1	13,9 \pm 11,1	18,2 \pm 14

* Estatisticamente significativo quando $P < 0,05$ (Mann-Whitney U test)

Expressão de mRNA nos Monócitos

Observou-se nos monócitos purificados um aumento significativo da expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 nos dois grupos com LES quando comparado com o grupo controlo.

Uma expressão de mRNA de CCL2 bastante elevada foi também encontrada no grupo de doentes com LES activo em comparação com a observada no grupo controlo e no grupo de doentes com LES inactivo.

A expressão gênica de mRNA de CCL4 foi mais alta no grupo de doença LES inactiva tendo significado estatístico quando comparada com o grupo de doença activa.

Relativamente á expressão de mRNA de CCL5, não foram encontradas diferenças entre os grupos em estudo.

Expressão de mRNA nas células Dendríticas

Uma vez que o número de células dendríticas obtidas após a separação celular foi significativamente mais baixo do que o obtido nos monócitos, apenas foi avaliada a expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 nas células dendríticas mielóides e nas CD14^{-/low}/CD16⁺.

Expressão de mRNA nas células dendríticas CD14^{-/low}CD16⁺

Observou-se um aumento da expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 no grupo de doentes com LES activo quando comparado com o grupo controlo e no caso do CXCL9 também apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo de LES inactivo.

Expressão de mRNA nas células dendríticas mielóides

Nesta população celular não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão de CXCL9 e CXCL10 entre os grupos em estudo.

3.5. DISCUSSÃO DO ARTIGO

O LES é uma doença autoimune inflamatória. Os monócitos estão envolvidos na defesa do hospedeiro e na regulação da inflamação. As células dendríticas desempenham um papel crítico nas respostas imunes inata e adaptativa e também no desenvolvimento da tolerância. Vários distúrbios e anormalidades têm sido atribuídos a estas células no LES.

Vários estudos têm revelado a importância das quimiocinas na actividade da doença. Muitos destes estudos relataram elevados níveis séricos de algumas destas quimiocinas, bem como um aumento da expressão de mRNA nos leucócitos do sangue periférico destes doentes, particularmente com doença activa. Neste estudo, através da separação e purificação por *cell sorting* dos monócitos e diferentes subpopulações de células dendríticas, foi-se quantificar o mRNA de diferentes quimiocinas nestas células, permitindo um melhor enquadramento destas células e destas moléculas na fisiopatologia do LES.

Expressão de mRNA nos monócitos

A alteração da expressão de mRNA das quimiocinas observada nos monócitos de doentes com LES, nomeadamente em LES activo, está de acordo com alterações já observadas anteriormente neste tipo de doentes.

Os altos níveis de expressão de mRNA, de CCL2, CXCL9 e CCL4 observados nos monócitos de pacientes com LES são consistentes com outros relatos que encontraram níveis aumentados no soro destes doentes. Estes resultados podem ser associados à via de sinalização intracelular mediada pelo IFN- α , uma vez que níveis mais elevados de IFN- α foram associados com o aumento das quimiocinas em doentes com LES; sugerindo uma regulação positiva na produção de quimiocinas de acordo com os estudos de Bauer *et al.* De igual modo Quiang Fu sugeriu a importância do sistema do IFN tipo I na modulação da expressão de quimiocinas. Além disso o ambiente inflamatório do LES leva a alterações no equilíbrio das quimiocinas incluindo a mobilização dos monócitos.

A CCL2 está envolvida no recrutamento de monócitos para o foco de inflamação activo e pode actuar como um factor de polarização das células Th0 para um fenótipo Th2. Por sua vez, existem evidências, que os níveis de CXCL10 estão elevados no soro e nos tecidos de doentes com LES, e que pode estar envolvido numa grande variedade de manifestações clínicas que ocorrem no LES. Além disso, de acordo com Kong *et al*, os níveis de CXCL10 relacionam-se positivamente com a doença activa e podem representar um bom marcador de actividade e monitorização da doença.

Como foi reportado por Karonitsch *et al* existe um aumento da expressão génica de CXCL10 e CXCL9 nos monócitos de doentes com LES provavelmente devido à activação da via do IFN- γ , o que sugere que a transcrição de genes dependentes de STAT-1, como o do CXCL10 e CXCL9, que são induzidos pelo IFN- γ , estão aumentados nas células do sangue periférico de doentes com LES.

Os níveis elevados de quimiocinas nos tecidos periféricos podem resultar num inapropriado recrutamento de monócitos para os sítios de inflamação. Por outro lado a elevação sistémica de quimiocinas pode dessensibilizar os receptores de quimiocinas expressos em leucócitos activados, resultando numa perda dos mecanismos de migração e consequentes respostas inflamatórias globais.

Expressão de mRNA nas células dendríticas CD14^{low}CD16⁺

Tal como os monócitos, a subpopulação de células dendríticas CD16⁺ apresenta uma elevada expressão de mRNA das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 no grupo de doentes com LES activo.

Apesar dos monócitos e das células dendríticas CD14^{low}CD16⁺ serem subconjuntos celulares diferentes, as semelhanças observadas pelos nossos dados relativamente à expressão de quimiocinas sugere uma provável relação entre estes subgrupos celulares e também um papel comum na fisiopatologia do LES, como já relatado anteriormente.

Expressão de mRNA nas células dendríticas mielóides

Os nossos resultados não demonstraram diferenças na expressão genética de CXCL9 e CXCL10 nas mDC. Um estudo realizado por Gerl *et al*, mostrou que não ocorriam diferenças na expressão dos receptores de quimiocinas CCR7, CCR1 e CCR5, o que parece indicar que a maioria das mDC do sangue periférico são células que saíram recentemente da medula óssea, funcionalmente imaturas, e por isso não vão traduzir o processo inflamatório que possa estar a ocorrer na periferia.

3.6. ARTIGO

O artigo de investigação “*Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus*” foi publicado na Revista Clinical and Developmental Immunology.

Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic cells subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus

Tiago Carvalho^{1***}, Ana Rodrigues^{2***}, Ana Lopes^{2***}, Luís Inês^{3, 4, 5}, Isabel Velada¹,
Andreia Ribeiro¹, António Martinho¹, José AP Silva^{3, 5}, Maria L Pais¹, Artur Paiva^{1,2}

Affiliations / Institutional mailing addresses

¹Histocompatibility Centre of Coimbra, 3001-301 Coimbra, Portugal

²Superior School of Health Technology of Coimbra, S. Martinho do Bispo, 3046-854 Coimbra, Portugal

³Rheumatology Department, University Hospital of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal

⁴School of Health Sciences, Beira Interior University, 6200-506 Covilhã, Portugal

⁵School of Medicine, University of Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal

E-mail addresses:

Tiago Carvalho: tiago.carvalho@gmail.com

Ana Rodrigues: anarodrigues98@gmail.com

Ana Lopes: ana.lopes.231@gmail.com

Luís Inês: luisines@gmail.com

Isabel Velada: ivelada@gmail.com

Andreia Ribeiro: andreia.marques.ribeiro@gmail.com

António Martinho: amartin@histocentro.min-saude.pt

José AP Silva: jdasilva@ci.uc.pt

Maria L Pais: lpais@histocentro.min-saude.pt

Artur Paiva: apaiva@histocentro.min-saude.pt

Research Article

Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus

Tiago Carneiro,^{1,2} Ana Rodrigues,² Ana Lopes,² Luís Inês,^{3,4,5} Isabel Velada,¹ Andreia Ribeiro,¹ António Martinho,¹ José A. P. Silva,^{3,5} Maria L. Pais,¹ and Artur Paiva^{1,2}

¹ Histocompatibility Centre of Coimbra, Edifício São Jerónimo, 4 Piso, Praceta Mota Pinto, 3001-301 Coimbra, Portugal

² College of Health Technology of Coimbra, S. Martinho do Bispo, 3046-854 Coimbra, Portugal

³ Rheumatology Department, University Hospital of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal

⁴ Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal

⁵ Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal

Correspondence should be addressed to Artur Paiva, artpaiva@gmail.com

Received 10 May 2012; Revised 10 July 2012; Accepted 17 July 2012

Academic Editor: Timothy B. Niewold

Copyright © 2012 Tiago Carneiro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abnormalities in monocytes and in peripheral blood dendritic cells (DC) subsets have been reported in systemic lupus erythematosus (SLE). We aim to clarify the tolerogenic or inflammatory role of these cells based on ICOSL or IFN- α and chemokine mRNA expression, respectively, after cell purification. The study included 18 SLE patients with active disease (ASLE), 25 with inactive disease (ISLE), and 30 healthy controls (HG). In purified plasmacytoid DC (pDC) was observed a lower ICOSL mRNA expression in ASLE and an increase in ISLE; similarly, a lower ICOSL mRNA expression in monocytes of ASLE patients was found. However, a higher ICOSL mRNA expression was observed in ASLE compared to HG in myeloid DCs. Interestingly, clinical parameters seem to be related with ICOSL mRNA expression. Regarding the inflammatory activity it was observed in purified monocytes and CD14^{+/low} CD16⁺ DCs an increase of CCL2, CXCL9, and CXCL10 mRNA expression in ASLE compared to HG. In myeloid DC no differences were observed regarding chemokines, and IFN- α mRNA expression. In pDC, a higher IFN- α mRNA expression was observed in ASLE. Deviations in ICOSL, chemokine, and IFN- α mRNA expression in peripheral blood monocytes and dendritic cells subpopulations in SLE appear to be related to disease activity.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystemic disease resulting from an abnormal immunological function that affects several organ systems characterized by a broad spectrum of clinical manifestations and a multitude of cellular abnormalities. The primary pathological findings in SLE patients are inflammation, vasculitis, immune complex deposition, and vasculopathy [1–3]. The exact etiology still remains unclear; however defective clearance of apoptotic material and/or aberrant apoptosis, in combination with susceptible genetic background have been suggested to be involved in SLE development and progression [4–6].

SLE patients exhibit numerous aberrations in the immune system, comprising B cells, T cells, monocytes, and dendritic cells, resulting in B and T cell activation and consequent autoantibodies production against a large variety of autoantigens [2].

Abnormalities in monocyte phenotype and function have been identified in several autoimmune disorders, including SLE, which could contribute to disease pathogenesis [7, 8]. Likewise, dendritic cells (DCs) subsets are also implicated in SLE pathogenesis and progression [4, 9]. Recent studies have described alterations in the number of peripheral blood (PB) DCs, namely myeloid (mDC) and CD14^{+/low}CD16⁺ subsets, in their ability to produce

inflammatory cytokines, activation status, and chemokine receptors expression [10, 11].

The immunologic self-tolerance breakdown, particularly in the control of self- and non-self-discrimination, results in the development of autoimmune diseases. Therefore, elucidate the mechanisms that regulate self-tolerance is important to understand self-directed immune responses and the mechanisms underlying autoimmune diseases [12, 13]. The notable functional plasticity of DCs, their lineage and maturational status, stimulation by pathogen-derived products, the net effect of antigen dose, and cytokine milieu determine whether an immunogenic or tolerogenic response will be developed [14].

One important mediator of DCs tolerogenic activity is ICOSL (inducible costimulator ligand), which is mainly expressed in pDC, mDCs, immature B cells, and monocytes and appears to be involved in the induction of a suppressive effect in T cells under an inflammatory environment as seen in SLE [15]. ICOS is a costimulator molecule expressed on CD4⁺ T cells, which was associated with secretion of interleukin 10 (IL-10) [15–17]. IL-10 is produced by T cells and induces tolerance and anergy in effector T cell [18]. ICOS is expressed at high levels in Th2 and at low levels in Th1 cells and the expression of this molecule inhibits the secretion of IL-2 [16]. The activation of ICOS/ICOSL pathway induces a differentiation of effector T cells in regulatory T cell and a sustained Th2 response [19, 20].

SLE is characterized by an inflammatory immune response mediated, in part, by cytokines and chemokines produced by antigen presenting cells (APC) and other immune cells, contributing for disease development and progression.

Multiple links of evidence support the involvement of IFN- α in the primary pathogenesis of SLE; high levels of serum IFN- α have been detected in SLE patients and have long been related with SLE pathogenesis [21]. Plasmacytoid DC (pDC) subpopulation is an important mediator of antiviral immunity through their extraordinary ability to secrete high levels of IFN- α in response to many DNA and RNA viruses and, in this sense, has been closely related to SLE physiopathology [22, 23].

There is a growing evidence suggesting that infiltration of T lymphocytes and other leukocytes into the sites of inflammation plays a critical role in organ involvement in SLE [24]. Chemokines have an important role in the migration and homing, necessary for the initiation of a cellular immune response in the sites of inflammation, and are able to regulate a differential recruitment of T helper (Th1 and Th2) lymphocytes [25].

Alterations in the cytokine and chemokine profile in SLE patients compared to normal controls have been described and reflect alterations in the inflammatory environment [2, 26, 27]. Chemokines like CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL4, and CCL5 present raised levels in SLE patients serum and may be related to disease activity, contributing to the inflammatory disorder [28, 29].

In this context, we evaluated the regulatory function of peripheral blood monocytes, mDCs, CD14^{low}CD16⁺ DCs, and pDCs subsets by the ICOSL mRNA expression and, on

the other hand, we assessed the inflammatory role of these cells by the mRNA expression of IFN- α and the chemokines CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL4, and CCL5.

2. Methods

2.1. Patients and Samples. Forty-three SLE patients were enrolled in the study, eighteen with active disease (ASLE) (100% female, mean age 33 ± 11 years) and twenty-five with inactive disease (ISLE) (84% female, mean age 33 ± 10 years). Patients were recruited fulfilling the 1997 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE [30]. All patients are followed at the Lupus Clinic, Rheumatology Department of the University Hospital of Coimbra. After assessing disease activity at the time of evaluation, according to the SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI 2k) [30, 31], SLE patients were divided into two groups, one with active (SLEDAI 2k ≥ 5 ; $n = 18$) and the other with inactive (SLEDAI 2k < 5 ; $n = 25$) SLE [32]. The patients medication, at time of evaluation and additional clinical and therapeutic regimen, was recorded at the time of analysis (Table 1).

The healthy control group (HG) consisted of 30 healthy individuals (90% female; mean age 30 ± 6 years). These participants were required to complete a brief questionnaire regarding previous or current medical conditions. All were free from autoimmune disease, active inflammatory condition and were not undergoing treatment with any immunomodulatory drugs.

K3-EDTA-anticoagulated peripheral blood samples were collected from each participant and FACS-sorted within 18 hours after collection.

2.2. Ethics. The study protocol was approved by the local ethics committee. All participants gave and signed informed consent and the principles of Helsinki Declaration were respected.

2.3. Cell Sorting of Monocytes, CD14^{low}CD16⁺ DC, mDCs, and pDCs. For the cell sorting of monocytes, CD14^{low}CD16⁺ DC, mDCs, and pDCs, 3 mL of each K3-EDTA PB sample were added to 10 mL of NH₄Cl solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) in order to lyse red blood cells. After 20 minutes of incubation, samples were centrifuged (5 minutes, at $540 \times g$) and the cell pellet was stained with the following monoclonal antibodies (mAb): anti-CD16 fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sanquin–Pelicuster, Amsterdam, The Netherlands), anti-CD33 phycoerythrin (PE), anti-CD45 peridinin chlorophyll protein (PerCP) (BDB, San Jose, CA, USA), anti-HLA-DR phycoerythrin cyanine 7 tandem (PECy7) (BDB), and anti-CD123 allophycocyanin (APC) (Macs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Once incubated for 20 minutes at room temperature in the darkness, the cells were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco BRL-life Technologies, Vienna, Austria).

Cell sorting and purification were performed in FACSAria II cell sorter (BDB) using the FACSDiva software (BDB). Monocytes were identified and sorted by

TABLE 1: Clinical findings in 43 patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

	ASLE (<i>n</i> = 18)	ISLE (<i>n</i> = 25)
Mean SLEDAI scores	9.7 ± 3.2	1.6 ± 0.9
Mean time since diagnosis	7.6 ± 7.4	9.0 ± 6.0
Lupus nephritis	44.4%	61.3%
Neurolupus	0%	19.4%
Lupus arthritis	66.7%	58.1%
Haematological involvement	100%	87.1%
Lupus cutaneous involvement	77.8%	74.2%
Severe Lupus*	44.4%	71%
Anti-dsDNA antibodies**		
Low positive	11.1%	32.3%
Moderately positive	22.2%	22.6%
High positive	55.6%	6.5%
Treatment		
Hydroxychloroquine	94.4%	87.1%
Immunosuppressants***	66.7%	32.3%
Steroids****	83.4%	12.9%
Low dose	46.6%	100%
Moderate dose	33.3%	0%
High dose	20.1%	0%

ASLE: Active disease group.

ISLE: Inactive disease group.

*Lupus severity in accordance with cumulative major organ involvement.

**Anti-dsDNA antibodies: low positive (<20 IU); moderately positive (20–50 IU); high positive (>50 IU).

***Azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine, tacrolimus, methotrexate, cyclophosphamide, or rituximab.

****Low dose, upto 10 mg/day; moderate dose, 10–30 mg/day; high dose, more than 30 mg/day; *n* = sample investigated.

HLA-DR⁺/CD33^{high}/CD45^{high} phenotype, and the three DCs subpopulations, characterized by intermediate forward (FSC) and side scatter (SSC) between those of lymphocytes and monocytes, were purified according to the following immunophenotype features: myeloidDCs (mDCs) present HLA-DR^{high}/CD33^{high}/CD16^{neg}/CD123^{dim} immunophenotype, CD14^{−/low}CD16⁺ DC subset are HLA-DR^{inter}/CD33^{inter}/CD123^{inter}, and plasmacytoid DCs (pDC) are HLA-DR^{high}/CD123^{high}CD33^{neg/dim}/CD16^{neg} (Figure 1) [33, 34]. The number of cells obtained of each cell population after FACSaria cell sorting is described in Table 2.

After cell sorting, the purity of the isolated cell populations was evaluated in the FACSCanto II flow cytometer (BDB) using the FACSDiva software (BDB) and acquiring a representative number of sorted cells, and it was consistently greater than 90%.

2.4. Gene Expression Analysis after Sorting of Monocytes, Dendritic Cells Subsets. Sorted cell populations were centrifuged for 5 minutes at 300 g and the pellet was resuspended in 350 μ L of RLT Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and the total RNA extraction was performed with the RNeasy Micro kit (Qiagen) according to the

supplier's instructions. Total RNA was eluted in a 14 μ L volume of RNase-free water. In order to quantify the amount of total RNA extracted and verify RNA integrity, samples were analyzed using a 6000 Nano Chip kit, in an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and 2100 expert software, according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed with SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Relative quantification of gene expression by real-time PCR was performed in the LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Real-time PCR reactions were carried out using 1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 1X QuantiTect Primer Assay (IFNA1 QT00201964, ICOSLG QT00004669, CCL2 QT00212730, CCL4 QT01008070, CCL5 QT00090083, CXCL9 QT00013461, and CXCL10 QT01003065) (Qiagen), and 20 ng of cDNA sample, in a total volume of 10 μ L. The reactions were performed using the following thermal profile: 15 min at 95°C, 50 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C. Melting point analysis was done to ensure amplification of the specific product. Real-time PCR results were analyzed with the LightCycler software (Roche Diagnostics). GeNorm Reference Gene Selection kit (Primer Design Ltd., Southampton, UK) in conjunction with the geNorm software (Primer Design Ltd.) were used to select the reference genes to normalize data. The reference genes used for gene expression analysis in monocytes were ATP synthase (ATP5B) and the beta-2-microglobulin (B2 M); in mDC and CD14^{−/low}CD16⁺ DC were the B2 M and ubiquitin-c (UBC); in pDC were the B2 M and ATP5B. The normalized gene of interest expression levels were calculated by using the delta-Ct method [35].

2.5. Statistical Analyses. Statistical evaluation of data was analyzed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test between the studied groups. All statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics 20 software (Armonk, NY, USA) and differences were considered as statistically significant when the *P* value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Frequency of Peripheral Blood Monocytes, CD14^{−/low}CD16⁺ DCs, mDCs, and pDCs in SLE Patients and Healthy Control Group. As shown in Table 3, frequency of peripheral blood mDCs and pDCs was lower in ASLE group than in control group, particularly pDCs. A lower pDC frequency was also observed in ISLE group compared to HG. In contrast, no significant differences were found in the frequency of circulating monocytes and CD14^{−/low}CD16⁺ DCs. We also verified a lower absolute number of monocytes in ASLE compared to HG as well as a lower number of peripheral blood pDCs in SLE patients, especially in ALSE group.

Since the number of dendritic cells obtained after cell sorting was significantly lower than those of monocytes, we only evaluated the mRNA expression of IFN- α , ICOSL,

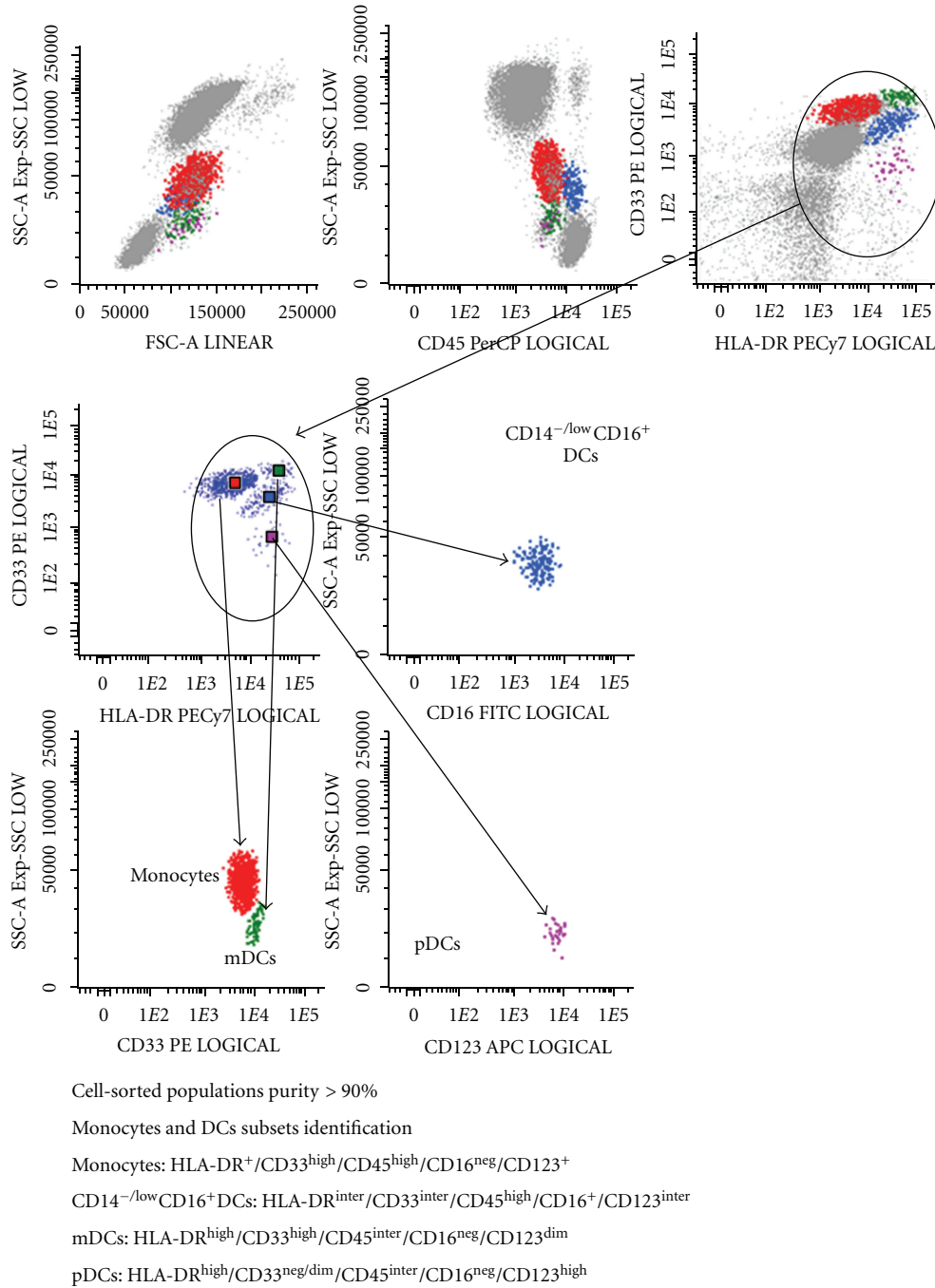


FIGURE 1: Flow cytometry gate strategy to obtain purified monocytes and peripheral blood dendritic cells by cell sorting.

CXCL9, and CXCL10 on mDCs and CD14^{-/low}CD16⁺ dendritic cells and of IFN- α and ICOSL on pDCs (Table 2).

3.2. Tolerogenic Role of Monocytes, CD14^{-/low}CD16⁺ DCs, mDCs, and pDCs Based on ICOSL mRNA Expression. Concerning the tolerogenic function of monocytes and DCs subsets, a lower mRNA expression of ICOSL was observed in ASLE compared to HG in monocytes (Figure 2(b)) and, on the other hand, an increased ICOSL mRNA expression in mDCs from both SLE groups compared to HG, was found (Figure 4(a)).

No significant differences were observed in CD14^{-/low}CD16⁺DC subset between the studied groups (Figure 3(a)).

Moreover, in pDC subpopulation, a lower ICOSL mRNA expression in ASLE and higher in ISLE compared to HG was observed (Figure 5(b)).

3.3. Inflammatory Role of Monocytes, CD14^{-/low}CD16⁺ DCs, mDCs, and pDCs Based on Chemokines and IFN- α mRNA Expression. In purified monocytes was observed a significant increase of CXCL9 and CXCL10 mRNA expression in both SLE groups compared to HG (Figures 2(d) to 2(e)). Similarly

TABLE 2: Number of sorted monocytes and peripheral blood dendritic cells in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

	HG (n = 30)	ASLE (n = 18)	ISLE (n = 25)
Number of sorted cells			
Monocytes	143701 ± 110950	91029 ± 83915	115407 ± 10558
CD14 ^{-/low} CD16 ⁺ DCs	15393 ± 18486	9667 ± 11976	7251 ± 3903
mDCs	8709 ± 7107	4365 ± 3228	3771 ± 3076
pDCs	5281 ± 3894	1363 ± 1291	3416 ± 2655

HG: Healthy control group.

ASLE: Active disease group.

ISLE: Inactive disease group.

TABLE 3: Frequency and absolute value of monocytes and peripheral blood dendritic cells in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

	HG (n = 30)	ASLE (n = 18)	ISLE (n = 25)
Frequency (%)			
Monocytes	3.9 ± 0.97	3.02 ± 1.61	3.56 ± 1.32
CD14 ^{-/low} CD16 ⁺ DCs	0.54 ± 0.29	0.45 ± 0.30	0.55 ± 0.33
mDCs	0.29 ± 0.18*	0.21 ± 0.15**	0.29 ± 0.32
pDCs	0.10 ± 0.07*	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.07***
Absolute Value (cells/μL)			
Monocytes	284,6 ± 84,2*	193,3 ± 97,5	228,4 ± 87,1
CD14 ^{-/low} CD16 ⁺ DCs	39,2 ± 23,2	28,1 ± 20	34,1 ± 19,1
mDCs	21,4 ± 15,1	13,9 ± 11,1	18,2 ± 14
pDCs	7.08 ± 5.16*	1.24 ± 1.28**	3.82 ± 3.51***

Note: results are expressed as mean ± standard deviation.

Statistically significant differences were considered when $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test): *HG versus ASLE; **ASLE versus ISLE, ***HG versus ISLE.

HG: healthy control group.

ASLE: active disease group.

ISLE: inactive disease group.

a higher mRNA CCL2 expression was observed in ASLE compared to HG and ISLE (Figure 2(c)). Moreover CCL4 mRNA expression was higher in ISLE, reaching statistical significance when compared with ASLE group (Figure 2(f)). Regarding IFN- α and CCL5 mRNA expression, no differences were found between the studied groups (Figures 2(a) and 2 (g)).

In CD14^{-/low}CD16⁺ DC subset a higher CXCL10 and CXCL9 mRNA expression in ASLE was noted, when compared with HG, and in the latter chemokine, when compared with ISLE (Figures 3(c) to 3(d)). The evaluation of the IFN- α mRNA expression did not present significant differences between the studied groups (Figure 3(b)).

Regarding the mDCs subpopulation, we did not found statistical significant differences for IFN- α , CXCL9, and CXCL10 mRNA expression between the studied groups (Figures 4(b) to 4(d)).

IFN- α mRNA expression evaluated on pDC subset revealed a significant increase in both SLE groups when compared with HG, particularly in ASLE (Figure 5(a)).

3.4. ICOSL mRNA Expression and Clinical Parameters. When we grouped SLE patients based on the amount of anti-dsDNA antibodies in negative, low (<20 IU), moderate (20–50 IU), and high positive (>50 IU), we found, in pDC, an increase on ICOSL mRNA expression in the groups without anti-dsDNA antibodies and lower positive, when compared with moderate and high positive groups. Inline with this observation, we also detected a significant increase of ICOSL expression in mDC on negative group and in a lower extension in high positive group, when compared with lower and moderate positive groups. Moreover, in CD14^{-/low}CD16⁺DC, we found a decrease on ICOSL expression on moderate-positive group when compared with high-positive and negative groups (Figure 6).

Concerning cutaneous involvement, we found, in SLE patients without this clinical feature, an increase on ICOSL mRNA expression in pDC. Also, an increase of its expression was observed in mDC in patients with this clinical parameter (Figure 7).

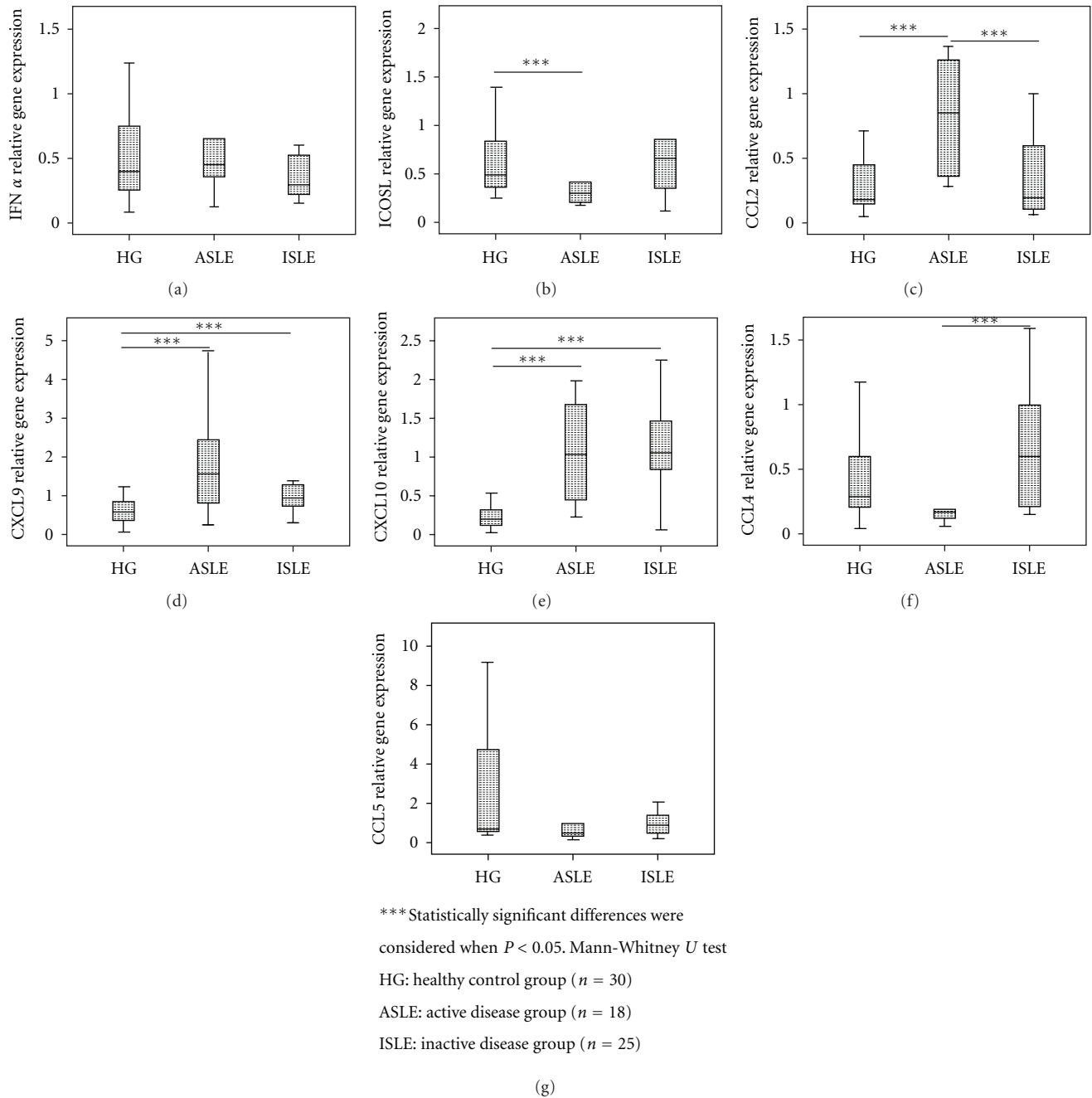


FIGURE 2: IFN- α , ICOSL, CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL4, and CCL5 relative gene expression in cell-sorted monocytes in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

No more statistical significant differences were found relating other clinical parameters and/or other studied molecules.

4. Discussion

Monocytes and DCs are involved in the host defense and regulation of inflammation, playing a critical role in both adaptive and innate immune responses and in tolerance development. SLE is a variable autoimmune inflammatory

condition, associated to tissue destruction wherein several abnormalities and disturbances have been attributed to these cells in SLE [8, 26, 36].

The tolerogenic function mainly attributed to pDC is, in part, mediated by the expression of ICOSL which has the ability to generate anergy in T cells and induce differentiation of *naïve* T cells into regulatory T cells [32, 37, 38].

The lower levels of ICOSL mRNA expression observed in pDC from ASLE patients could be related to the higher inflammatory peripheral environment, due to increased

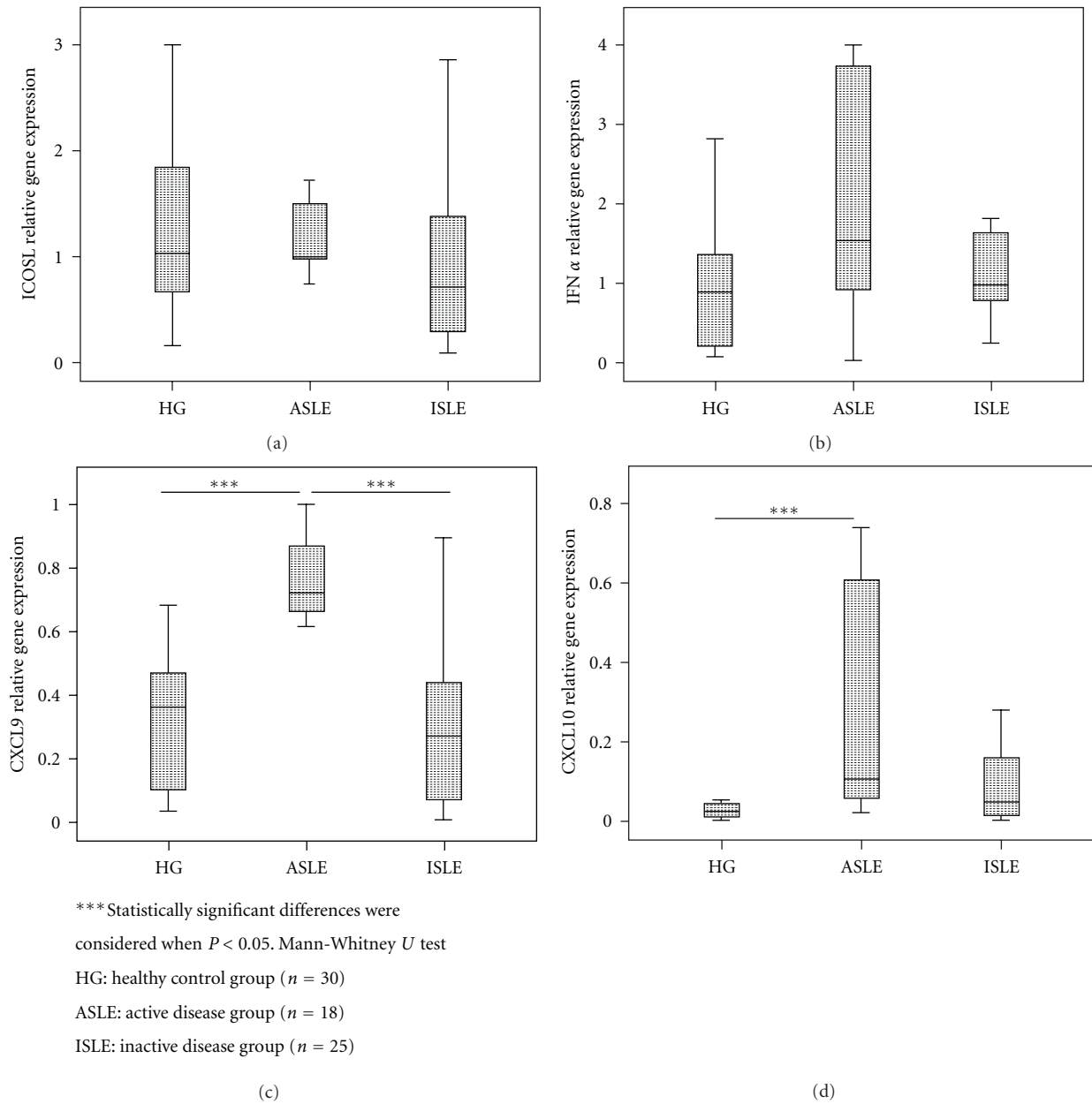


FIGURE 3: IFN- α , ICOSL, CXCL9, and CXCL10 relative gene expression in cell-sorted CD14^{-low}CD16⁺ DCs subset in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

levels of proinflammatory cytokines and the presence of circulating immune complexes, which is inline with the higher levels of IFN- α mRNA found in these cells. The opposite was observed in ISLE, namely, higher mRNA expression of ICOSL and lower of IFN- α . This pattern of ICOSL expression in pDC was also observed in SLE patients without anti-dsDNA antibodies or with lower levels, as well as in the group of patients without skin involvement.

In fact, the lower mRNA expression of ICOSL and the mechanisms involved in ICOS/ICOSL pathway are related to loss of tolerance to self-antigens that occur in SLE, especially

in patients in active phase [32, 37, 38]. It is described that the absence of interaction of ICOS with its ligand overrides the induction of anergy in T cells, considered the first step in the differentiation of T helper cells into T suppressor cells [15]. The reduction of ICOSL expression may also be explained, at least in part, by a negative feedback mechanism by which high levels of ICOS lead to the decrease of ICOSL expression. Since it was reported that active SLE patients have an increased expression of ICOS on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, thus, apparently, exists a negative correlation between these two molecules [16, 39]. Results of Yang et al. showed

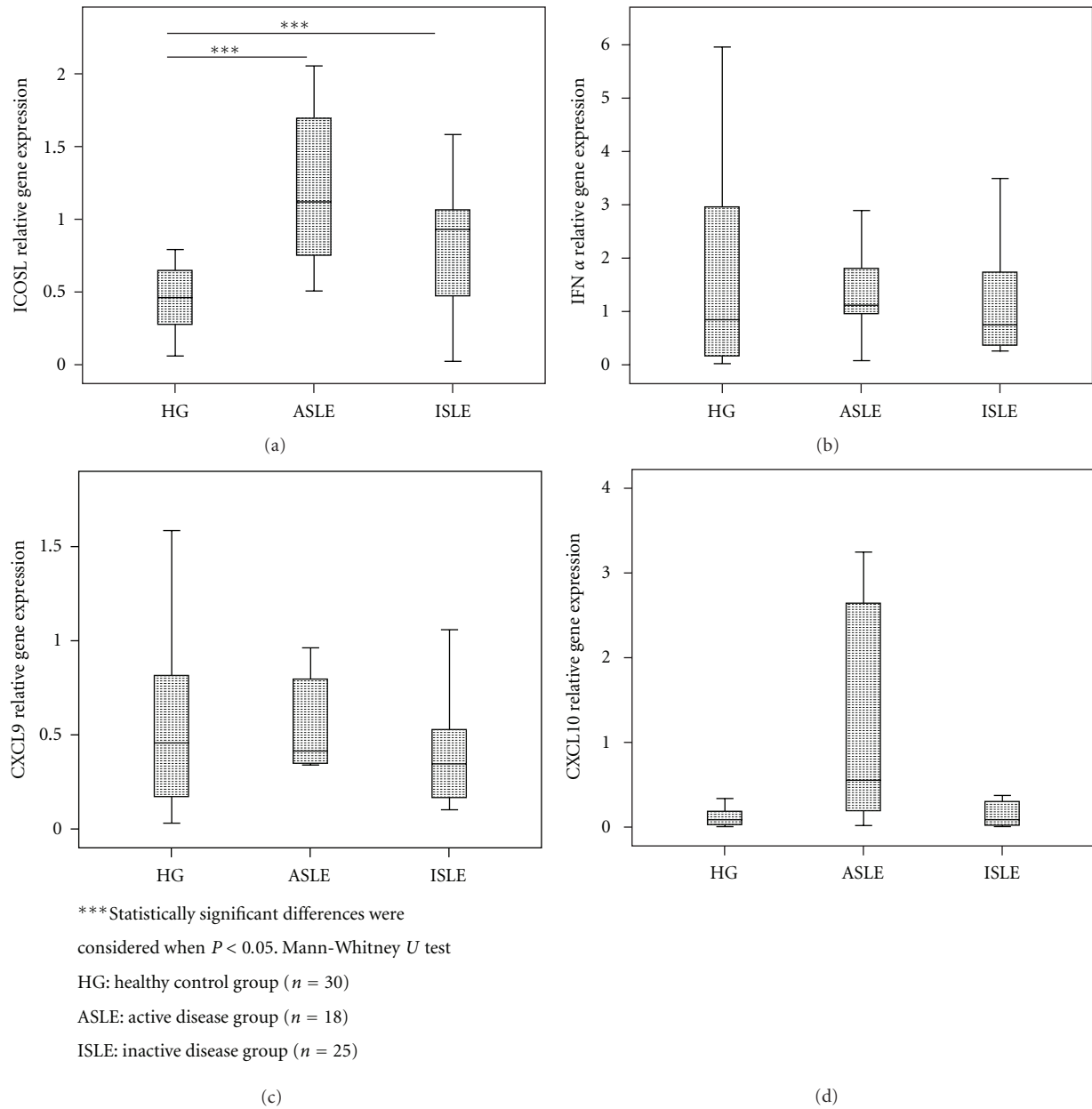


FIGURE 4: ICOSL, IFN- α , CXCL9, and CXCL10 relative gene expression in cell-sorted mDCs subset in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

a decreased expression of ICOS on CD4+ and CD8+ T cells from ISLE patients when compared with ASLE, resulting in a possible increase of ICOSL in these patients [16].

As observed in pDC, ICOSL mRNA expression in monocytes is reduced when compared to the HG, probably due to the same mechanisms observed in pDC. On contrary, high mRNA expression of this molecule was observed in mDC from ASLE and, in a lower extent, for ISLE patients when compared with control group, which could mean that this subpopulation of dendritic cells is less sensitive to the peripheral inflammatory environment, probably due to the fact that the majority of peripheral blood mDCs are recent immigrants from bone marrow with an immature

phenotype, which could be particularly true in SLE patients, where an increase migration of these cells to peripheral tissues could induce an increase in the hematopoiesis of this cell lineage [40, 41]. In line with this explanation is the fact that no statistical significant differences were observed in this cells for IFN- α and chemokines mRNA expression among the studied groups. Furthermore the more immature status of mDC could be also the explanation for the higher mRNA expression of ICOSL found in patients with skin involvement, to where occurs an increased mDC migration.

Previous data have reported elevated levels of IFN- α in the SLE patient's serum [42, 43], which is in agreement with the higher mRNA expression of this cytokine in pDC

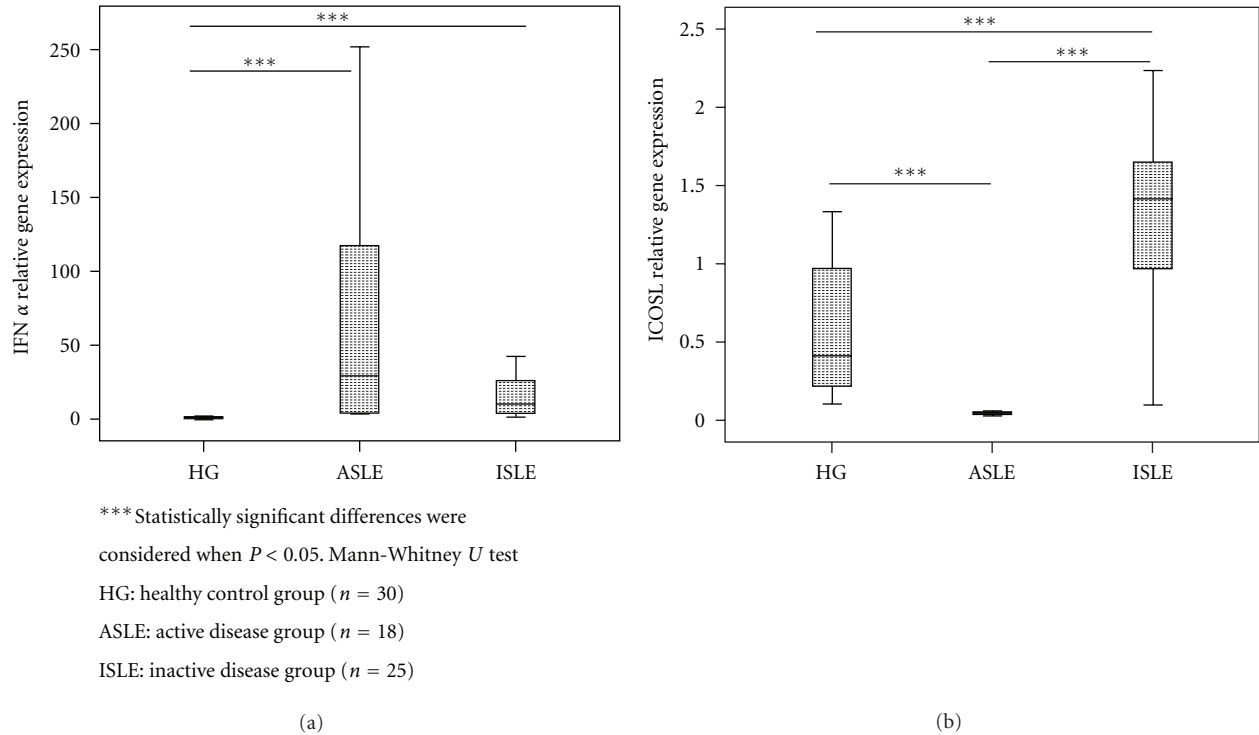


FIGURE 5: IFN- α and ICOSL relative gene expression in cell-sorted pDCs subset in the three studied groups (HG, ASLE, and ISLE).

from SLE patients, particularly in those with active disease. Dall'Era et al. and Kirou et al. related the serological levels of IFN- α with SLE clinical manifestations and disease activity [42, 44].

IFN- α is a pleiotropic cytokine, important in the immune regulation, that is produced by multiple cell types in response to viral infection. pDCs have a special role in the IFN- α production and are the most important sources of serum interferon [45]. IFN- α can affect multiple cell types involved in SLE and has the potential to influence the development, progression, and pathogenesis of SLE as it can control the function and activation states of most important immune cell subsets and function as a bridge between innate and adaptive immunity [46].

Some studies have demonstrated that the frequency of circulating pDCs is markedly reduced in SLE patients [47, 48]. However, functional studies revealed that pDCs, upon stimulation, have a normal IFN- α producing capacity, which means that aberrant pDC activation may be an important step in autoimmune diseases like SLE. In fact, an important finding was that the immune complexes present in SLE patients serum contain nucleic acids that are internalized via the Fc γ RIIa, reach the endosome, and stimulate TLR7 and/or TLR9, leading to subsequent activation of transcription factors and IFN- α production [49, 50].

Several studies have revealed the important role of chemokines and IFN- α in SLE activity. Many have reported high levels of those in the serum as well as of mRNA chemokine expression in peripheral blood leukocytes of these patients, particularly in active disease [29, 51, 52].

DCs subtypes have individual functions and appear to influence multiple processes that may activate or regulate autoreactive B cells. Part of their influence is dictated by their receptors and cytokines profiles and also by their location [9]. In the present study the use of purified peripheral blood monocytes and DCs subpopulations emphasizes the role of these cells in SLE pathophysiology, based on their chemokine expression.

The altered chemokines mRNA expression observed on monocytes in SLE patients, namely, in ASLE, is in accordance with the abnormalities already observed in these patients [8, 53]. The high levels of CCL2, CXCL9, and CCL4 mRNA expression observed on monocytes from SLE patients are consistent with other reports that have found increased levels in serum from these patients [52, 54]. These findings may be associated to the IFN- α pathway, since higher levels of IFN- α have been associated with increased levels of chemokines in SLE patients, suggesting an upregulation of this chemokine production according to Bauer et al. studies [28, 54]; likewise Quiong Fu has suggested the importance of type I IFN system in modulating chemokine expression, linking these two networks in the SLE pathogenesis [55].

Moreover, the inflammatory environment of SLE may lead to chemokine imbalance, including monocyte mobilization. CCL2 is involved in monocyte recruitment into focus of active inflammation and may act as a potent factor in the polarization of Th0 cells toward a Th2 phenotype [56]. In turn, there is increasing evidence that CXCL10 levels are elevated in serum and in tissues of SLE patients, contributing to a large variety of SLE manifestations [57].

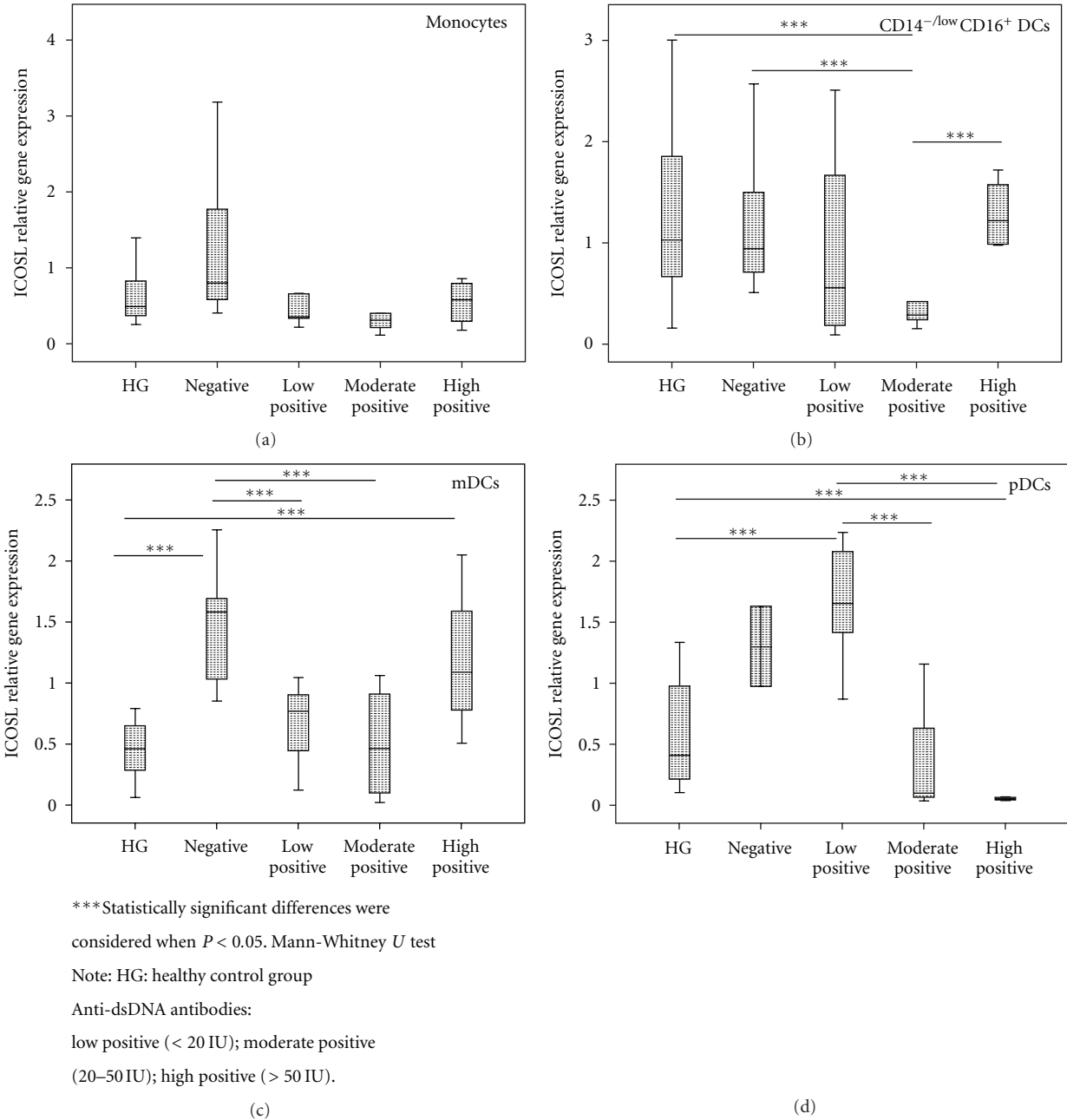


FIGURE 6: ICOSL relative gene expression in cell-sorted monocytes and DCs subsets, according to the amount of anti-dsDNA antibodies: negative; low, moderate, and high positive.

Furthermore, according to Kong et al. data, CXCL10 levels correlate positively with SLE disease activity and may represent a fair marker for monitoring disease activity [58]. As reported by Karonitsch et al., CXCL10 and CXCL9 mRNA expressions in monocytes were increased in SLE patients, associated with increased responsiveness of monocytes to IFN- γ , confirmed by mRNA levels of IFN-inducible STAT-1-dependent CXCL10 and CXCL9 genes [59].

Like monocytes, CD14^{-/low}CD16⁺ DC subpopulation presented higher levels of CXCL9 and CXCL10 mRNA expression in ASLE group. This data point to a common

role of these cells in SLE pathophysiology, as we previously reported [10].

Apparently less sensitive to microinflammatory changes than monocytes, CD14^{-/low}CD16⁺ DC express Fc γ RII CD16⁺ [60], which allow these cells to respond to peripheral activators motifs like circulating immune complexes. Moreover, these cells are tissue derived, reentering in the peripheral circulation, as previously reported [61, 62], reflecting in the periphery the tissue injury.

As we previously described, no significantly differences on CXCL9 and CXCL10 mRNA expression in mDC were

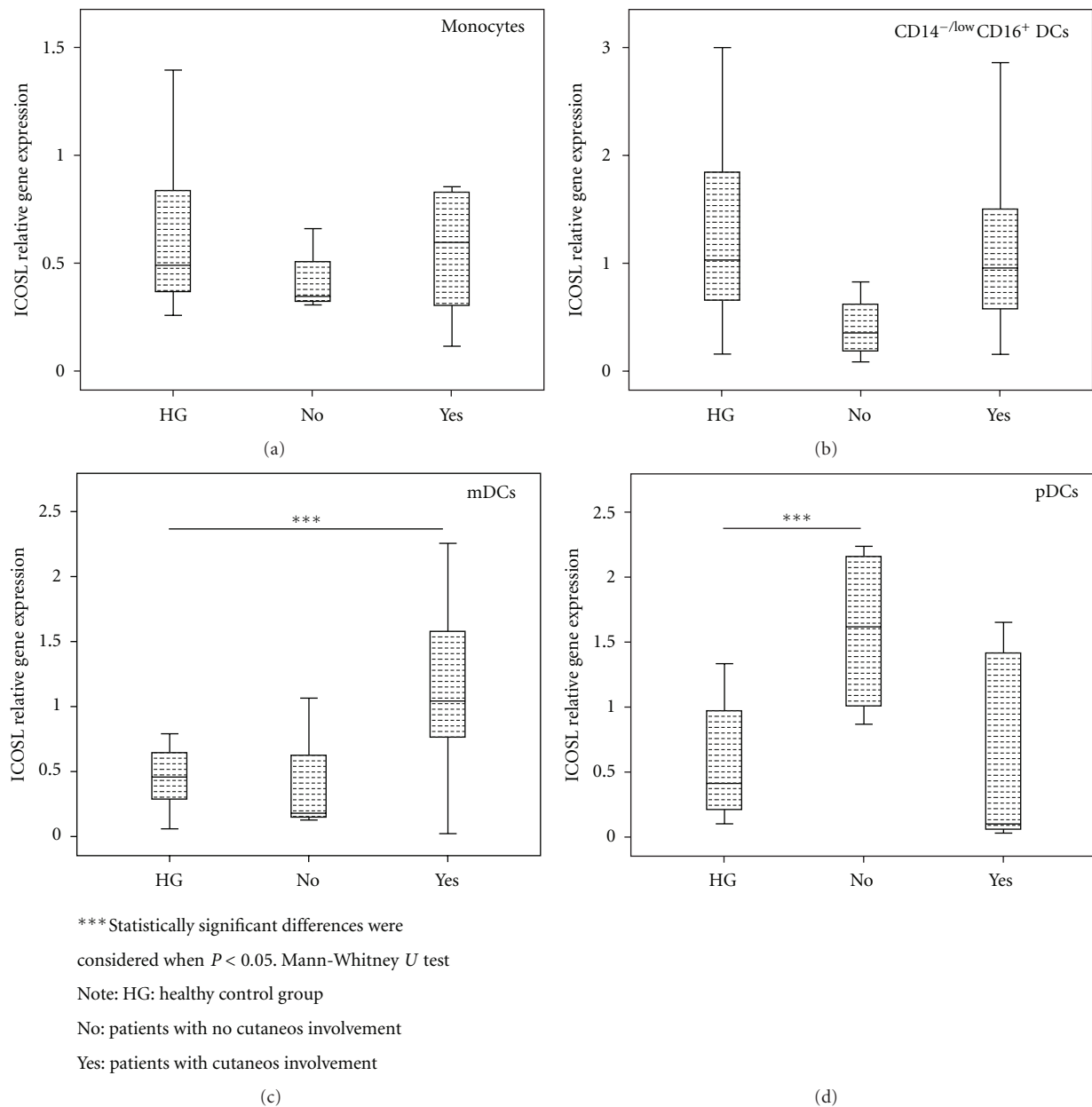


FIGURE 7: ICOSL relative gene expression in cell-sorted monocytes and DCs subsets, according to the cutaneous involvement of SLE patients.

observed in SLE patients, when compared with the control group. In agreement with our data, Gerl et al. reported no differences in the expression of CCR7, CCR1, and CCR5 chemokine receptors in mDC from SLE patients [11].

In conclusion our data clearly demonstrates a different role for monocytes and DCs subsets in SLE pathophysiology.

In active disease, peripheral blood monocytes and CD14^{-/low}CD16⁺ DCs exhibit an upregulation of chemokine expression, probably due to a higher activation status in the periphery, contributing to the recruitment of neutrophils, monocytes/macrophages, and T and NK cells to peripheral tissues.

In turn, pDCs upregulate IFN- α and downregulate ICOSL mRNA expression in ASLE, exhibiting a pro-inflammatory profile and, conversely, in ISLE they seem to display a more tolerogenic activity.

Authors' Contribution

T. Carvalho, A. Rodrigues, and A. Lopes contributed equally to this paper.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

- [1] A. Doria, M. Zen, M. Canova et al., "SLE diagnosis and treatment: when early is early," *Autoimmunity Reviews*, vol. 10, no. 1, pp. 55–60, 2010.
- [2] C. C. Mok and C. S. Lau, "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 56, no. 7, pp. 481–490, 2003.
- [3] P. P. Smith and C. Gordon, "Systemic lupus erythematosus: clinical presentations," *Autoimmunity Reviews*, vol. 10, no. 1, pp. 43–45, 2010.
- [4] J. H. Fransen, J. V. D. Vlag, J. Ruben, G. J. Adema, J. H. Berden, and L. B. Hilbrands, "The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 12, no. 2, article 207, 2010.
- [5] U. S. Gaip, L. E. Munoz, G. Grossmayer et al., "Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)," *Journal of Autoimmunity*, vol. 28, no. 2–3, pp. 114–121, 2007.
- [6] M. Herrmann, R. E. Voll, O. M. Zoller, M. Hagenhofer, B. B. Ponner, and J. R. Kalden, "Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 41, no. 7, pp. 1241–1250, 1998.
- [7] C. G. Katsiari, S. N. C. Liossis, and P. P. Sfikakis, "The pathophysiological role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 39, no. 6, pp. 491–503, 2010.
- [8] Y. Li, P. Y. Lee, and W. H. Reeves, "Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 58, no. 5, pp. 355–364, 2010.
- [9] H. M. Seitz and G. K. Matsushima, "Dendritic cells in systemic lupus erythematosus," *International Reviews of Immunology*, vol. 29, no. 2, pp. 184–210, 2010.
- [10] A. Henriques, L. Inês, T. Carvalho et al., "Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus," *Rheumatology International*, vol. 32, no. 4, pp. 863–869, 2012.
- [11] V. Gerl, A. Lischka, D. Panne et al., "Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 7, pp. 1370–1377, 2010.
- [12] A. Okamoto, K. Fujio, T. Okamura, and K. Yamamoto, "Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 463412, 2011.
- [13] A. G. Thompson and R. Thomas, "Induction of immune tolerance by dendritic cells: implications for preventative and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease," *Immunology and Cell Biology*, vol. 80, no. 6, pp. 509–519, 2002.
- [14] S. Rutella, S. Danese, and G. Leone, "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age," *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1435–1440, 2006.
- [15] A. Tuettenberg, E. Huter, M. Hubo et al., "The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 6, pp. 3349–3356, 2009.
- [16] J. H. Yang, J. Zhang, Q. Cai et al., "Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus," *Rheumatology*, vol. 44, no. 10, pp. 1245–1254, 2005.
- [17] M. Kawamoto, M. Harigai, M. Hara et al., "Expression and function of inducible co-stimulator in patients with systemic lupus erythematosus: possible involvement in excessive interferon- γ and anti-double-stranded DNA antibody production," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 8, no. 3, article R62, 2006.
- [18] E. J. Witsch, M. Peiser, A. Hutloff et al., "ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells," *European Journal of Immunology*, vol. 32, no. 9, pp. 2680–2686, 2002.
- [19] M. Her, D. Kim, M. Oh, H. Jeong, and I. Choi, "Increased expression of soluble inducible costimulator ligand (ICOSL) in patients with systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 18, no. 6, pp. 501–507, 2009.
- [20] B. L. Colvin, T. L. Sumpter, D. Tokita, J. Salati, A. L. Mellor, and A. W. Thomson, "Allostimulatory activity of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cells is independent of indoleamine dioxygenase but regulated by inducible costimulator ligand expression," *Human Immunology*, vol. 70, no. 5, pp. 313–320, 2009.
- [21] T. B. Niewold, "Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 31, no. 12, pp. 887–892, 2011.
- [22] M. Gilliet, W. Cao, and Y. J. Liu, "Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 8, pp. 594–606, 2008.
- [23] L. Rönnblom, G. V. Alm, and M. L. Eloranta, "Type I interferon and lupus," *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 21, no. 5, pp. 471–477, 2009.
- [24] R. W. Hoffman, "T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus," *Frontiers in Bioscience*, vol. 6, pp. D1369–D1378, 2001.
- [25] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, "Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression," *Immunological Reviews*, vol. 177, pp. 134–140, 2000.
- [26] S. Sule, A. Rosen, M. Petri, E. Akhter, and F. Andrade, "Abnormal production of pro- and anti-inflammatory cytokines by lupus monocytes in response to apoptotic cells," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e17495, 2011.
- [27] S. L. Yu, W. P. Kuan, C. K. Wong, E. K. Li, and L. S. Tam, "Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 715190, 2012.
- [28] J. W. Bauer, M. Petri, F. M. Batliwalla et al., "Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 10, pp. 3098–3107, 2009.
- [29] L. C. W. Lit, C. K. Wong, L. S. Tam, E. K. M. Li, and C. W. K. Lam, "Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 65, no. 2, pp. 209–215, 2006.
- [30] C. Bombardier, D. D. Gladman, M. B. Urowitz, D. Caron, and Chi Hsing Chang, "Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 35, no. 6, pp. 630–640, 1992.
- [31] D. D. Gladman, D. Ibañez, and M. B. Urowitz, "Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000," *Journal of Rheumatology*, vol. 29, no. 2, pp. 288–291, 2002.

- [32] B. Griffiths, M. Mosca, and C. Gordon, "Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices," *Best Practice and Research*, vol. 19, no. 5, pp. 685–708, 2005.
- [33] I. Crespo, A. Paiva, A. Couceiro, P. Pimentel, A. Orfão, and F. Regateiro, "Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells," *Stem Cells and Development*, vol. 13, no. 1, pp. 63–70, 2004.
- [34] J. M. Morgado, R. Pratas, P. Laranjeira et al., "The phenotypical and functional characteristics of cord blood monocytes and CD14^{−/low}/CD16⁺ dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation," *Transplant Immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 55–63, 2008.
- [35] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn et al., "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes," *Genome Biology*, vol. 3, no. 7, p. RESEARCH0034, 2002.
- [36] D. Ding, H. Mehta, W. J. McCune, and M. J. Kaplan, "Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 9, pp. 5878–5889, 2006.
- [37] S. V. Lourenço, F. R. G. De Carvalho, P. Boggio et al., "Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate," *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 34, no. 7, pp. 558–564, 2007.
- [38] J. Z. Gillis, P. Panopalis, G. Schmajuk, R. Ramsey-Goldman, and J. Yazdany, "Systematic review of the literature informing the systemic lupus erythematosus indicators project: reproductive health care quality indicators," *Arthritis Care and Research*, vol. 63, no. 1, pp. 17–30, 2011.
- [39] M. Watanabe, Y. Takagi, M. Kotani et al., "Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 8, pp. 5222–5234, 2008.
- [40] R. Saxena, T. Mahajan, and C. Mohan, "Lupus nephritis: current update," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 13, no. 5, article 240, 2011.
- [41] W. Vermi, E. Riboldi, V. Wittamer et al., "Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 4, pp. 509–515, 2005.
- [42] M. C. Dall'Era, P. M. Cardarelli, B. T. Preston, A. Witte, and J. C. Davis, "Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 64, no. 12, pp. 1692–1697, 2005.
- [43] L. Rönnblom and G. V. Alm, "Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 5, no. 2, pp. 68–75, 2003.
- [44] K. A. Kirou, C. Lee, S. George, K. Louca, M. G. E. Peterson, and M. K. Crow, "Activation of the interferon- α pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 52, no. 5, pp. 1491–1503, 2005.
- [45] P. Fitzgerald-Bocarsly, J. Dai, and S. Singh, "Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 3–19, 2008.
- [46] T. B. Niewold, D. N. Clark, R. Salloum, and B. D. Poole, "Interferon alpha in systemic lupus erythematosus," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 948364, 2010.
- [47] S. Blomberg, M. L. Eloranta, M. Magnusson, G. V. Alm, and L. Rönnblom, "Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon- α by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 48, no. 9, pp. 2524–2532, 2003.
- [48] B. Cederblad, S. Blomberg, H. Vallin, A. Perers, G. V. Alm, and L. Rönnblom, "Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon- α -producing cells," *Journal of Autoimmunity*, vol. 11, no. 5, pp. 465–470, 1998.
- [49] U. Båve, M. Magnusson, M. L. Eloranta, A. Perers, G. V. Alm, and L. Rönnblom, "Fc γ R1a is expressed on natural IFN- α -producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN- α production induced by apoptotic cells combined with Lupus IgG," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 6, pp. 3296–3302, 2003.
- [50] H. Vallin, S. Blomberg, G. V. Alm, B. Cederblad, and L. Rönnblom, "Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- α) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 115, no. 1, pp. 196–202, 1999.
- [51] E. C. Baechler, F. M. Batliwalla, G. Karypis et al., "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 5, pp. 2610–2615, 2003.
- [52] L. M. Vilá, M. J. Molina, A. M. Mayor, J. J. Cruz, E. Ríos-Olivares, and Z. Ríos, "Association of serum MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus," *Clinical Rheumatology*, vol. 26, no. 5, pp. 718–722, 2007.
- [53] F. Steinbach, F. Henke, B. Krause, B. Thiele, G. R. Burmester, and F. Hiepe, "Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 59, no. 4, pp. 283–288, 2000.
- [54] J. W. Bauer, E. C. Baechler, M. Petri et al., "Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus," *PLoS Medicine*, vol. 3, no. 12, article e491, 2006.
- [55] Q. Fu, X. Chen, H. Cui et al., "Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 10, no. 5, article R112, 2008.
- [56] S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya, "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 29, no. 6, pp. 313–325, 2009.
- [57] E. Y. Lee, Z. H. Lee, and Y. W. Song, "CXCL10 and autoimmune diseases," *Autoimmunity Reviews*, vol. 8, no. 5, pp. 379–383, 2009.
- [58] K. O. Kong, A. W. Tan, B. Y. H. Thong et al., "Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 156, no. 1, pp. 134–140, 2009.
- [59] T. Karonitsch, E. Feierl, C. W. Steiner et al., "Activation of the interferon- γ signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood mononuclear cells," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 5, pp. 1463–1471, 2009.

- [60] J. Almeida, C. Bueno, M. C. Algueró et al., "Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage⁻/CD16⁺/HLA-DR⁺/CD14^{-/low} cells, CD14⁺ monocytes, and CD16⁻ dendritic cells," *Clinical Immunology*, vol. 100, no. 3, pp. 325–338, 2001.
- [61] D. Alvarez, E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian, "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration," *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 325–342, 2008.
- [62] R. Bonasio and U. H. von Andrian, "Generation, migration and function of circulating dendritic cells," *Current Opinion in Immunology*, vol. 18, no. 4, pp. 503–511, 2006.

4. DISCUSSÃO

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença caracterizada por várias condições associadas à destruição tecidular. Os monócitos estão envolvidos em mecanismos de defesa do hospedeiro e regulação da inflamação e as células dendríticas desempenham um papel fundamental na resposta adaptativa e imune e mais recentemente foram também associadas com o desenvolvimento da tolerância imune.

Os nossos resultados evidenciam que o número absoluto de monócitos em doentes com LES activo é significativamente menor que no grupo controlo. Este facto vem ao encontro de outros estudos que documentam que os monócitos estão severamente alterados na sua função e fenótipo apresentando também um baixo número de marcadores monócíticos no sangue periférico de doentes com LES activo. (10, 32) Tanto o número como o estado de activação dos monócitos circulantes poderiam ser um marcador clínico de monitorização da doença no entanto mais estudos teriam de ser realizados para suportar esta teoria. Nesta mesma linha, foi descrito que os macrófagos renais activados são marcadores do início e da remissão em nefrite lúpica. (33-34) É preciso salientar que a leucopenia é uma das características hematológicas desta doença. (5)

Uma diminuição acentuada da frequência de células dendríticas mielóides foi verificada no grupo de doentes com LES activo, o que vai ao encontro de estudos recentes. (12, 35). Como o Lúpus eritematoso sistémico é caracterizado por inflamação crónica provocada, pelo mesmo em parte, por quantidades elevadas de citocinas e de outras moléculas capazes de induzir alterações fenotípicas e funcionais nas células dendríticas, durante o período activo da doença, o que pode induzir uma migração destas células da circulação sanguínea para os tecidos. (12, 35)

Esta diminuição das células dendríticas no sangue periférico pode também estar associada a um aumento da apoptose nestas células. (35)

A maturação precoce das células dendríticas em LES, na ausência de sinais extrínsecos, sugere que estas células podem tornar-se células apresentadoras de autoantígenos muito eficientes, e não células com actividade tolerogénica, conduzindo a respostas autoimunes características desta patologia. A maturação das células dendríticas promove e activa as células T no baço e noutros órgãos linfáticos contribuindo para uma hiperreactividade e activação descrita no LES. (36) Também está provado que

o soro de pacientes com SLE induz a diferenciação de monócitos em células dendríticas. (7, 13, 35)

Vários estudos revelaram a importância das quimiocinas e do IFN- α na severidade do Lúpus Eritematoso Sistémico e muitos reportaram os altos níveis destes no soro e o aumento da sua expressão de mRNA em leucócitos do sangue periférico especialmente na fase activa da doença. (24, 30, 37)

Neste trabalho fomos avaliar, após *cell sorting*, o papel dos monócitos e das diferentes subpopulações de células dendríticas, bem como das quimiocinas produzidas por estas células, na fisiopatologia do LES.

A produção de quimiocinas pelas células do sangue periférico de doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico parece encontrar-se significativamente mais alta do que nos indivíduos saudáveis, o que sugere um envolvimento destas proteínas na desregulação imune que ocorre nesta doença. (30)

A expressão elevada, obtida no nosso estudo, de mRNA das quimiocinas CCL2, CXCL10 e CXCL9 nos monócitos vai ao encontro de vários estudos que evidenciam um aumento destas proteínas no soro de doentes com LES activo. (24, 30, 38)

Outros estudos associam o aumento das quimiocinas no soro ao aumento da expressão de genes induzida pelo Interferão- α . (38-39)

Um outro estudo observou que a expressão dos níveis de quimiocinas induzidas pelo interferão α encontrava-se mais elevado em monócitos quando comparado com os observados nos linfócitos B e T de doentes com LES, indicando que os monócitos contribuem mais para a *pool* das quimiocinas séricas que os linfócitos. (33)

Estes achados apontam para a possibilidade de as quimiocinas poderem vir a ser usadas como novos biomarcadores para a avaliação da actividade da doença.

Para além das implicações do IFN- α na expressão de quimiocinas, o próprio ambiente inflamatório no LES pode conduzir a alterações no gradiente de quimiocinas levando à mobilização exacerbada de monócitos. A expressão de mRNA da quimiocina CCL2 (MCP-1) nos monócitos encontra-se bastante elevada no grupo de doentes com LES activa, este aumento pode estar relacionado com o recrutamento dos monócitos para o local do foco activo da inflamação. A maioria dos monócitos expressa CCR2, o receptor de MCP-1. (21, 28)

Além do recrutamento direccionado de leucócitos outras evidências indicam que a CCL2 influencia a imunidade celular das células T. A expressão de CCL2 está associada com a polarização de respostas no sentido Th2. (21, 40)

A MCP-1 estimula produção de IL-4 e a sua sobreexpressão está associada a defeitos na imunidade mediada por células T do tipo Th1, indicando que pode estar envolvida na polarização Th2. A MCP-1 influencia tanto a imunidade inata, através do seu efeito nos monócitos, como na imunidade adquirida através do controlo da polarização das células T, até porque tem capacidade de recrutar para os sítios de inflamação, células T memória. (21, 40, 41) Neste sentido, esta quimiocina pode tornar-se um bom alvo para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias. (40) Uma medição seriada dos níveis de MCP-1 na urina de doentes com Nefrite Lúpica mostrou-se útil para monitorizar e identificar uma nova terapêutica com anti-quimiocinas. (42)

No nosso estudo, a expressão de mRNA de CCL4 ou Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP-1 β) nos monócitos, encontrava-se aumentada no grupo de doentes com LES Inactivo. Esta quimiocina é menos eficiente no recrutamento e activação de monócitos que a MCP-1. (16)

Os níveis serológicos de MIP-1 β estão elevados em doentes com LES e estão mais relacionados com a lesão nos tecidos inflamados. (33)

A expressão de mRNA de CCL5 ou RANTES nos monócitos não apresenta variações entre os grupos em estudo. Uma explicação para este resultado pode ter a ver com os níveis elevados desta quimiocina no soro em doentes com LES, o que leva à dessensibilização dos receptores desta quimiocina. Alguns estudos indicam que migração específica induzida pela RANTES em monócitos no LES é baixa. (43)

Existem outros estudos que indicam que o CCR5, um dos receptores da CCL5, é expresso nos monócitos do líquido sinovial mas não nos do sangue periférico de doentes com artrite reumatóide. A RANTES produz os seus efeitos nos monócitos através de diferentes receptores, com variados efeitos, dependendo do receptor que a célula expressa, da sua localização e do microambiente envolvente. (23) A ligação da RANTES com os seus receptores em pacientes com LES também varia com o decurso da doença e com o tratamento usado. A RANTES é um ligando para vários receptores incluindo o CCR1, CCR3 e CCR5, enquanto que a MCP-1 tem um receptor específico, o CCR2. (18)

Estudos em pacientes com nefrite Lúpica mostram que quimiocinas inflamatórias, especialmente a MCP1 e a RANTES, são detectadas no tecido renal. (18)

Relativamente á expressão de mRNA de CXCL10, esta encontra-se aumentada nos doentes com LES Activo e Inactivo como foi descrito em várias doenças autoimunes. (44) CXCL10, também designada proteína 10 induzida por Interferão- γ , é caracterizada funcionalmente como uma quimiocina do tipo Th1. Geralmente os linfócitos do sangue periférico de doentes com LES mostram um perfil Th2, embora as células Th1 e o

Interferão- γ , sejam importantes para o desenvolvimento do LES. O Interferão- γ é produzido nos nódulos linfáticos e participa no desenvolvimento da glomerulonefrite em LES. (29)

Existe uma grande evidência que os níveis de CXCL10 aumentados, tanto no soro como nos tecidos e nas células infiltradas que expressam CXCR3, podem participar na fisiopatologia do LES. (29) O CXCL10 e o seu receptor CXCR3 estão envolvidos no recrutamento de leucócitos para os tecidos inflamados e na perpetuação da inflamação com consequente dano tecidual. (29)

Estudos *in vitro* mostram que as células mononucleares do sangue periférico de doentes com LES produzem espontaneamente grandes quantidades de CXCL10. (29, 44)

Os níveis no soro de CXCL10 observados na doença cutânea activa estão relacionados com a maior síntese de CXCL10 pelos macrófagos activados e queratinócitos nas lesões tecidulares. Foi mostrado que células T circulantes CD4+/CXCR3+ e CD4+/CCR2+ estão reduzidas na circulação sanguínea durante as crises de LES, pois são recrutadas para os tecidos inflamados onde quantidades aumentadas de CXCL10 estão a ser produzidas. (44)

Tal como a CXCL10, a CXCL9 é induzida pela via do Interferão- γ e a expressão genética do seu mRNA encontra-se também aumentada nos monócitos de doentes com LES activo e inactivo, quando comparados com o grupo de indivíduos saudáveis.

Tal como o IFN- α também o IFN- γ está implicado na fisiopatologia do LES. As células do sangue periférico dos doentes com LES expressam IFN- γ , estando os níveis desta proteína aumentados no soro destes doentes. (31, 45)

Um estudo anterior revelou um aumento dos níveis de mRNA de CXCL10 e de CXCL9 em monócitos, em resposta ao Interferão- γ , em doentes com LES, mais do que em indivíduos saudáveis. (45)

Os níveis serológicos das quimiocinas reguladas pelos Interferão tipo I e II podem servir como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de LES activo, particularmente a CXCL10. (31)

A quimiocina CXCL10 é a que está mais associada ao LES, podendo o seu valor serológico servir de biomarcador isolado na actividade da doença. (31)

A CXCL9 actua no mesmo receptor da CXCL10, o CXCR3. Esta quimiocina está envolvida na quimioatração de células T activadas e também no recrutamento de monócitos para os nódulos linfáticos inflamados. Uma expressão de CXCL9 no endotélio recruta selectivamente populações de monócitos para os locais de inflamação. (28, 46)

O aumento de quimiocinas nos tecidos periféricos resulta num recrutamento inapropriado de monócitos para os locais de inflamação, por outro lado uma elevação sistemática dos níveis de quimiocinas levam a uma dessensibilização dos receptores expressos nos leucócitos activados, resultando na perda de um tráfego normal e numa consequente resposta inflamatória global.

Tal como os monócitos, a subpopulação de células dendríticas CD14^{low}CD16⁺ apresentam níveis elevados de expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10. Embora estas subpopulações celulares sejam diferentes, as semelhanças em relação à expressão destas quimiocinas é notória. Provavelmente existe uma relação entre esta população e os monócitos que partilham um papel comum no desenvolvimento do LES, como foi previamente reportado. (10, 12)

As subpopulações de células dendríticas têm funções individuais e influenciam múltiplos processos que activam ou reprimem as células B autorreactivas. Parte das suas funções é mediada por citocinas, pelos seus receptores e a sua localização. (47)

Várias alterações no fenótipo e nas características funcionais foram encontradas nas células dendríticas mielóides. (36) No entanto, no nosso estudo não se verificaram alterações estaticamente significativas na expressão de mRNA de CXCL9 e de CXCL10, entre os diferentes grupos estudados.

Cravens et al mostrou que os precursores de células dendríticas exibem um perfil de migração único em resposta a várias quimiocinas. Neste estudo também verificaram que as células dendríticas mielóides não respondiam a CXCL10, mesmo em grandes concentrações, enquanto os monócitos migravam em resposta a este gradiente. (48)

Outros estudos também sugerem que as células dendríticas mielóides do sangue periférico expressam níveis mais baixos de quimiocinas do que as células dendríticas derivadas dos monócitos. (17, 22) A CXCL10 é produzida em quantidades mínimas por células dendríticas mielóides. (22)

Também foi demonstrado por Gerl *et al* não haver diferenças nos receptores de quimiocinas, CCR7, CCR1 e CCR5 nas mDC, isto pode indicar que estas não alteraram as suas funções migratórias no LES e que o papel das mDC não parece estar relacionado com estes mecanismos. (43)

5. CONCLUSÃO

O nosso estudo sugere um envolvimento diferente dos monócitos e dos subgrupos de células dendríticas na fisiopatologia do LES. Na fase activa do LES os monócitos e as células dendríticas CD14^{-low}/CD16⁺ apresentam uma elevada expressão de quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e monócitos/macrófagos como a CCL2 e de células T e NK como o CXCL9 e o CXCL10, o que indica que estas células e as quimiocinas por elas produzidas se encontram relacionadas com a actividade da doença

As células dendríticas mielóides do sangue periférico, representam na sua maioria, células imaturas vindas recentemente da medula óssea ou em migração para os tecidos periféricos ou órgãos linfóides secundários, através do sangue periférico, não tendo contactado ainda com antígenos, logo não apresentaram alterações no seu perfil de expressão de mRNA das quimiocinas CXCL9 e CXCL10.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shirai T, Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. *Springer Seminars in Immunopathology*. 2006;28(2):79-82.
2. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology*. 2003 July 1, 2003;56(7):481-90.
3. Rahman A, Isenberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(9):929-39.
4. Wenzel J, Zahn S, Tüting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus*. 2010 August 1, 2010;19(9):1020-8.
5. Manson J, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006;1(1):6.
6. Crispín JC, Liossis S-NC, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang Y-T, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(2):47-57.
7. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in Immunology*. [doi: 10.1016/j.smim.2005.05.013]. 2005;17(4):313-8.
8. Grage-Griebenow E, Flad H-D, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001 January 1, 2001;69(1):11-20.
9. Li Y, Lee P, Reeves W. Monocyte and Macrophage Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2010;58(5):355-64.
10. Katsiari CG, Liossis S-NC, Sfrikakis PP. The Pathophysiologic Role of Monocytes and Macrophages in Systemic Lupus Erythematosus: A Reappraisal. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(6):491-503.
11. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007 March 1, 2007;81(3):584-92.
12. Henriques A, Inês L, Carvalheiro T, Couto M, Andrade Â, Pedreiro S, et al. Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*. 2011:1-7.
13. Crispin JC, Alcocer-Varela J. The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. [doi: 10.1016/j.autrev.2007.01.014]. 2007;6(7):450-6.

14. Nie Y, Mok M, Chan G, Chan A, Jin O, Kavikondala S, et al. Phenotypic and functional abnormalities of bone marrow-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12(3):R91.
15. Almeida J, Bueno C, Algueró MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative Analysis of the Morphological, Cytochemical, Immunophenotypical, and Functional Characteristics of Normal Human Peripheral Blood Lineage- CD16^+ /HLA-DR $^+$ /CD14 $^-$ /lo Cells, CD14 $^+$ Monocytes, and CD16 $^-$ Dendritic Cells. *Clinical Immunology*. [doi: 10.1006/clim.2001.5072]. 2001;100(3):325-38.
16. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 August 1, 1997;90(3):909-28.
17. Vissers JLM, Hartgers FC, Lindhout E, Teunissen MBM, Figdor CG, Adema GJ. Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001 May 1, 2001;69(5):785-93.
18. Eriksson C, Eneslätt K, Ivanoff J, Rantapää-Dahlqvist S, Sundqvist K-G. Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2003 October 1, 2003;12(10):766-74.
19. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol*. [10.1038/ni.f.214]. 2008;9(9):949-52.
20. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*. [doi: 10.1016/S1074-7613(00)80165-X]. 2000;12(2):121-7.
21. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. [doi: 10.1089/jir.2008.0027]. 2009 2009/06/01;29(6):313-26.
22. Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L. Cutting Edge: Differential Chemokine Production by Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2002 December 15, 2002;169(12):6673-6.
23. Katschke KJ, Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, et al. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(5):1022-32.
24. Vilá L, Molina M, Mayor A, Cruz J, Ríos-Olivares E, Ríos Z. Association of serum MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*. 2007;26(5):718-22.
25. Lema GPD, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, et al. Chemokine Expression Precedes Inflammatory Cell Infiltration and Chemokine Receptor

- and Cytokine Expression during the Initiation of Murine Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001 July 1, 2001;12(7):1369-82.
26. Dieu-Nosjean M, Vicari A, Lebecque S, Caux C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999 August 1, 1999;66(2):252-62.
 27. Song A, Nikolcheva T, Krensky AM. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunological Reviews*. 2000;177(1):236-45.
 28. Muller WA. New Mechanisms and Pathways for Monocyte Recruitment. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001 November 5, 2001;194(9):F47-F52.
 29. Lee EY, Lee Z-H, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. [doi: 10.1016/j.autrev.2008.12.002]. 2009;8(5):379-83.
 30. Lit LCW, Wong CK, Tam LS, Li EKM, Lam CWK. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006 February 1, 2006;65(2):209-15.
 31. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(10):3098-107.
 32. Steinbach F, Henke F, Krause B, Thiele B, Burmester G-R, Hiepe F. Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000 April 1, 2000;59(4):283-8.
 33. Fu Q, Chen X, Cui H, Guo Y, Chen J, Shen N, et al. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Research & Therapy*. 2008;10(5):R112.
 34. Schiffer L, Bethunaickan R, Ramanujam M, Huang W, Schiffer M, Tao H, et al. Activated Renal Macrophages Are Markers of Disease Onset and Disease Remission in Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology*. 2008 February 1, 2008;180(3):1938-47.
 35. Ewa Robak PS, Anna Wozniacka, Anna Sysa-Jedrzejska, Henryk Stepień, Tadeusz Robak Relationship between peripheral blood dendritic cells and cytokines involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus European Cytokine Network. 2004;15(3):222-30.
 36. Ding D, Mehta H, McCune WJ, Kaplan MJ. Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2006 November 1, 2006;177(9):5878-89.

37. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 March 4, 2003;100(5):2610-5.
38. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, Batliwalla FM, Crawford D, Ortmann WA, et al. Elevated Serum Levels of Interferon-Regulated Chemokines Are Biomarkers for Active Human Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS Med*. [doi:10.1371/journal.pmed.0030491]. 2006;3(12):e491.
39. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon- α pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(5):1491-503.
40. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. [10.1038/35006097]. 2000;404(6776):407-11.
41. Weber C, Belge K, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000 May 1, 2000;67(5):699-704.
42. Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 February 1, 2005;16(2):467-73.
43. Gerl V, Lischka A, Panne D, Großmann P, Berthold R, Hoyer BF, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010 July 1, 2010;69(7):1370-7.
44. Kong KO, Tan AW, Thong BYH, Lian TY, Cheng YK, Teh CL, et al. Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clinical & Experimental Immunology*. 2009;156(1):134-40.
45. Karonitsch T, Feierl E, Steiner CW, Dalwigk K, Korb A, Binder N, et al. Activation of the interferon- γ signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(5):1463-71.
46. Janatpour MJ, Hudak S, Sathe M, Sedgwick JD, McEvoy LM. Tumor Necrosis Factor-dependent Segmental Control of MIG Expression by High Endothelial Venules in

Inflamed Lymph Nodes Regulates Monocyte Recruitment. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001 November 5, 2001;194(9):1375-84.

47. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. [10.1038/32588]. 1998;392(6673):245-52.

48. Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(5):497-505.